



**Preparación de materiales  
moleculares nanoparticulados y  
dispersos  
–vesículas y microemulsiones–  
empleando fluidos comprimidos**

Antonia María Cano Sarabia

Tesis Doctoral

Dirigida por Dr. Nora Ventosa y Prof. Jaume Veciana

Programa de doctorado de Ciencia de Materiales

Departamento de Química

Facultad de Ciencias

2009



**NORA VENTOSA RULL**, Investigadora Científica y **JAUME VECIANA MIRÓ**, Profesor de Investigación, del CSIC en el Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona (ICMAB-CSIC)

CERTIFICAN

Que **ANTONIA MARÍA CANO SARABIA**, Ingeniero Químico, ha realizado bajo su dirección el Trabajo de investigación que lleva el título: **“Preparación de Materiales Moleculares Nanoparticulados y Dispersos –Vesículas y Microemulsiones- Empleando Fluidos Comprimidos”**. Dicho trabajo ha sido desarrollado dentro del programa de doctorado de Ciencia de Materiales de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para que así conste, firma el presente certificado.

Dra. Nora Ventosa Rull

Prof. Jaume Veciana Miró

Bellaterra, 16 de Julio de 2009



*ciber-66n*



# AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación se ha llevado a cabo en el Departamento de Nanociencia Molecular y Materiales Orgánicos del Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona (ICMAB-CSIC) bajo la dirección de Dra. Nora Ventosa Rull y Prof. Jaume Veciana Miró.

De forma general, quería dar mis más gratos agradecimientos a todas aquellas personas que han hecho posible que este trabajo sea una realidad.

Particularmente, quiero comenzar dando las gracias a Prof. Jaume Veciana y a Prof. Concepción Rovira por acogerme en su grupo y darme la oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación. Asimismo, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Nora Ventosa, quién a parte de una constante e imprescindible tutela para el desarrollo de este trabajo, ha visto superado el rol de excelente docente por el de una magnífica persona, por su esfuerzo, su disposición, que no conoce horarios, ni días de la semana y atención hacía mí, incluso durante la amarga convalecencia.

Por otro lado, me gustaría agradecer al Ministerio de educación y ciencia (beca FPU), al CSIC y al CIBER-BBN por el financiamiento recibido durante esta Tesis.

También me gustaría agradecer a todas las personas que han colaborado directamente en el trabajo de investigación realizado en esta Tesis. Especialmente quiero dar las gracias al Dr. Jordi Esquena y a la Prof. Conxita Solans (CID-CSIC), por la cálida bienvenida reciba en su grupo, y por su ayuda en las medidas de SWAXS y microscopia. Asimismo quiero dar las gracias a los doctorandos Alex Vílchez y Meritxel Llinás por su ayuda en los intentos de utilizar el HPLC y a Jon Vilasau por el soporte en las medidas de SWAXS.

I also thank to Dra. Angelina Angelova, Prof. Sylviane Lesieur and Prof. Michel Ollivon for give me the opportunity to collaborate with them and discover me the “liposomes world” in Paris.

Asimismo quiero dar las gracias a Emilio de la Serna y Raúl Solanas por su excelente disposición y colaboración en el trabajo experimental llevado a cabo en los laboratorios de Carburos Metálicos S.E. en MATGAS.

Igualmente quiero hacer una mención especial al grupito de Supercríticos, al Dr. Santiago Sala, Dra. María Muntó, Alba Córdoba, Daniel Villanueva, Elisa Elizondo e

Ingrid Cabrera (Figurita) por su estrecha colaboración y buen ambiente vivido durante el desarrollo de este trabajo.

He de agradecer también a Cristina Patiño y Rocío Arranz por su ayuda con el microscopio cryo-TEM (CNB-CSIC), y al Dr. Xavier Álvarez y Dr. Jaume Comas por su ayuda en la medida de distribuciones de tamaño de partículas (SCT-UB). Asimismo también quiero dar las gracias a la Dra. Emma Rossynol (UAB) por su ayuda durante las “impredicibles” medidas de cryo-TEM.

Por otro lado, no pueden faltar mis más sinceros agradecimientos a todo el ICMAB, y especialmente a mi grupo NMMO, a los seniors David, Pepe, Elena, y Vladimir, y a todos los compañeros de batalla, Christian, Neil, Inma, Marta, Vega, Elba, Jordi, Patricia, Paco, Verónica, Rapha, Judit, Angela, Malena, Lourdes, Cesar, Mat, Adam, Magalí y Claudia. También quiero dar las gracias a todos aquellos que han pasado por nuestro grupo, Dani, Inhar y Daniel.

Durantes estos años he conocido a mucha gente muy divertida e interesante, pero sobretodo quiero destacar la amistad con Nuria, Emi, Amable y Josep, esa complicidad adquirida, hace que me falten las palabras para expresar lo vivido juntos, y que sobren los kilómetros para sentirlos siempre cerca. Muchas gracias por las historias mil.

Por supuesto, no me puedo olvidar de mis compañeros de despacho Aurelio, Jordi y Santi, gracias por la ayuda en la interpretación de diagramas de fases y compartir tan buenos momentos con Barquisimeto.

También quiero dar las gracias a mis compañeros de piso durante todos estos años, Lino, Berta, y Alberto por soportarme cuando tomo canela! Tampoco puede faltar, una mención especial para mis apoyos directos desde el bando de la huerta murciano, Isa y Abel, Gema y Claudio, Sera, Tomaca y Noemí, María José y Lorena.

Quiero dar también las gracias a mi primito Antonio por está magnífica y tan profesional portada.

Por último, quiero dar las gracias a mis padres, Carmen y Cecilio, por estar siempre pendientes de mí, por su apoyo, ayuda, opiniones objetivas y por mostrarme lo que realmente importa. Asimismo, quiero dar las gracias a mis hermanos Carmina y Cecilio por sus ánimos, motivación y muchas risas a lo largo de estos años.

## Summary

# Preparation of molecular nanoparticulate and dispersed materials –vesicles and microemulsions- using compressed fluids

Nanotechnology is believed by many to be one of the most important scientific topics of the next decade with a huge impact on biology, pharmacology and medicine. In particular, medicine with its reliance on safe, potent, user-friendly, and target-specific therapies for important diseases such as cancer, infections or autoimmune disorders will profit from nanometer-sized devices for diagnostic and therapeutic applications.

Specifically, vesicles, injectable nanometer-sized particles and micelles made of advanced materials are currently under investigation for targeted delivery of toxic or water-insoluble drugs or contrast agents in biological systems. Necessary key elements for a secure and directed transport of such nanocarriers in the bloodstream are high chemical and mechanical stability, good biocompatibility and biodegradability, specific targeting and clearance properties, and most of all defined functionality.

Therefore, the development of reproducible, efficient, environmentally friendly and easy to scale-up methodologies for the production of nanoparticulate molecular materials with controlled size and supramolecular organization is of great industrial interest, since their pharmacological features are related to their nanostructure.

Conventional solvent-based methodologies have many problems associated to process scaling up, process-steps, reproducibility, processing times, consumption of energy, and limited control of particle characteristics over the final particulate material. Such drawbacks are originated because these solvent-based processes are driven by temperature and/or composition changes (temperature decrease, solvent evaporation, addition of salts, etc.), which are always slowly and non-homogeneously transmitted in liquid media.

Processes based on compressed fluids (CFs) have gained increasing attention as alternative solvent media because they overcome some of the limitations related to the traditional methods, offering alternative advantages of the final product. Thus, the solvation power of CFs in their liquid or supercritical state can be tuned by pressure changes, which propagate much more quickly and uniformly than temperature and

solvent composition changes. Therefore, CFs allow a much greater control and tuning of the structural characteristics of the final material (size, size distribution, porosity, polymorphic nature, morphology, etc.) than with conventional organic solvents. Indeed, processing with CFs often leads to materials with unique physicochemical characteristics, unattainable by conventional processing methodologies.

Therefore, the aim of this Doctoral Thesis is the development of new methodologies using supercritical fluids as solvent, for the preparation of uniform nanoparticulate molecular materials.

The first part deals with the development of the DELOS-SUSP process for the preparation of micro- and nanoparticulate dispersed systems. DELOS-SUSP process has shown to be efficient for the preparation of microscopic suspensions of different actives, such as cholesterol, “solvent blue 35” and ibuprofen, and small unilamellar vesicles (SUVs) with nanoscopic size, uniform shape and stability, unachievable by conventional procedures. The influence of the DELOS-SUSP operational parameters on the physicochemical characteristics of the obtained dispersed systems has been also deeply studied.

The second part of this Thesis is focused on the preparation of stable microemulsions using CO<sub>2</sub>-expanded solvents and their use for the realization of confined precipitations. On the basis of this concept, a new method has been developed for the straightforward preparation of submicro- and nanoparticulate materials. This new process named PIWASP (*P*ressure *I*nduced *W*ater *A*nti-*S*olvent *P*recipitation) has been used for the preparation of uniform spherical nanosized ibuprofen particles with a high crystalline grade unachievable nowadays by conventional crystallization methods using liquid solutions.

# Índice

|   |          |
|---|----------|
| <b>Capítulo 1</b>   |          |
| <b>Introducción y objetivos.....</b>  | <b>1</b> |
| 1.1 Objetivos.....  | 5        |
| 1.2 Referencias.....  | 6        |
| <br>  |          |
| <b>Capítulo 2</b>   |          |
| <b>Desarrollo del proceso “DELOS-SUSP” .....</b>  | <b>9</b> |
| 2.1 Suspensiones.....   | 9        |
| 2.1.1 Métodos de preparación de suspensiones.....   | 10       |
| 2.1.2 Preparación de suspensiones con fluidos comprimidos.....                                    | 14       |
| 2.2 Desarrollo del nuevo método de preparación de suspensiones basado en la tecnología DELOS..... | 15       |
| 2.2.1 Introducción al proceso DELOS.....  | 15       |
| 2.2.2 Desarrollo del nuevo proceso DELOS-SUSP para la preparación de suspensiones.....            | 17       |
| 2.2.3 Preparación de suspensiones de colesterol por DELOS-SUSP.....                               | 19       |
| 2.2.4 Desarrollo tecnológico del proceso DELOS-SUSP: Equipamiento y protocolo de operaciones..... | 21       |
| 2.3 Aplicación del proceso DELOS-SUSP.....  | 26       |
| 2.3.1 Preparación de suspensiones del colorante “solvent blue 35” mediante DELOS-SUSP.....        | 27       |
| 2.3.2 Preparación de suspensiones de “ibuprofeno” mediante DELOS-SUSP.....                        | 29       |
| 2.4 Utilización de tensoactivos en el proceso DELOS-SUSP.....                                     | 30       |
| 2.4.1 Influencia de la naturaleza del tensoactivo.....  | 31       |
| 2.4.2 Influencia de mezclas de tensoactivo de distinta naturaleza.....                            | 34       |
| 2.4.3 Influencia del procedimiento de adición del tensoactivo.....                                | 38       |
| 2.5 Conclusiones.....   | 42       |
| 2.6 Referencias.....  | 44       |

**Capítulo 3**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Estudio del proceso DELOS-SUSP para obtener vesículas unilamelares</b>   | <b>47</b> |
| 3.1 Introducción.....   | 47        |
| 3.1.1 Sistemas vesiculares.....   | 48        |
| 3.1.2 Preparación de sistemas vesiculares por metodologías convencionales...  | 51        |
| 3.1.3 Preparación de sistemas vesiculares con fluidos comprimidos.....  | 54        |
| 3.2 Autoensamblaje de colesterol y CTAB en un medio acuoso.....   | 56        |
| 3.2.1 Caracterización de la organización supramolecular en sistemas “CTAB/colesterol/agua”.....   | 58        |
| 3.2.2 Modelo del parámetro de empaquetamiento molecular aplicado al sistema CTAB/colesterol.....  | 67        |
| 3.2.3 Mecanismo de transición de micela a vesícula para el sistema CTAB/colesterol.....   | 69        |
| 3.3 Preparación de vesículas CTAB/colesterol por DELOS-SUSP: comparación con el proceso de precipitación convencional por mezclado.....                             | 71        |
| 3.4 Influencia de los parámetros de operación sobre las características de las vesículas CTAB/colesterol obtenidas por DELOS-SUSP.....                              | 79        |
| 3.4.1 Influencia de la fracción molar de dióxido de carbono.....  | 80        |
| 3.4.2 Influencia de la sobresaturación inicial del colesterol.....  | 82        |
| 3.5 Preparación de otros sistemas vesiculares por DELOS-SUSP.....   | 83        |
| 3.5.1 Preparación de sistemas vesiculares de fosfatidilcolina por DELOS-SUSP.....   | 83        |
| 3.5.2 Influencia de los parámetros de operación del proceso DELOS-SUSP sobre las características estructurales de los sistemas vesiculares de fosfatidilcolina..... | 88        |
| 3.5.3.1 Influencia de la fracción molar de dióxido de carbono.....  | 89        |
| 3.5.3.2 Influencia de la sobresaturación inicial del soluto.....  | 90        |
| 3.5.3.3 Influencia de las relación entre las fosfatidilcolina y el medio dispersante.....   | 90        |
| 3.6 Conclusiones.....   | 91        |
| 3.7 Referencias.....  | 92        |

**Capítulo 4****Preparación de emulsiones “oil-in-water” (o/w) con disolventes**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>expandidos con CO<sub>2</sub>.....</b>   | <b>97</b> |
| 4.1 Introducción.....   | 97        |
| 4.1.1 Microemulsiones como nanoreactores y contenedores a escala nanoscópica.....   | 99        |
| 4.1.2 Microemulsiones con fluidos comprimidos.....  | 102       |
| 4.2 Microemulsiones o/w con disolventes expandidos con CO <sub>2</sub> .....  | 104       |
| 4.2.1 Criterios de elección de los componentes de la microemulsión.....   | 104       |
| 4.2.2 Equipamiento y protocolo general de operaciones establecido para estudiar la viabilidad de formar microemulsiones con CO <sub>2</sub> ..... | 105       |
| 4.2.3 Microemulsiones en el sistema “etanol/agua/CO <sub>2</sub> ”.....   | 109       |
| 4.2.3.1 Diagrama de fases del sistema “etanol/agua/CO <sub>2</sub> ”.....   | 109       |
| 4.2.3.2 Preparación de microemulsiones o/w en sistemas “etanol/agua/CO <sub>2</sub> ”.....  | 113       |
| 4.2.4 Microemulsiones en sistemas “acetona/agua/CO <sub>2</sub> ”.....  | 118       |
| 4.2.4.1 Diagrama de fases del sistema “acetona/agua/CO <sub>2</sub> ”.....  | 118       |
| 4.2.4.2 Preparación de microemulsiones o/w en sistemas “acetona/agua/CO <sub>2</sub> ”.....   | 120       |
| 4.2.5 Influencia del uso de tensoactivos en las microemulsiones basadas en sistemas “acetona/agua/CO <sub>2</sub> ”.....                          | 127       |
| 4.3 Conclusiones.....   | 133       |
| 4.4 Referencias.....  | 134       |

**Capítulo 5****Preparación de materiales micro- y nanoparticulados a partir de microemulsiones o/w con disolventes expandidos con CO<sub>2</sub>: El proceso PIWASP.....**

|  |     |
|--|-----|
| <b>139</b>   |     |
| 5.1 Obtención de sólidos micro- y nanoparticulados mediante procesos de precipitación confinados utilizando microemulsiones..... | 140 |
| 5.1.1 Preparación de sólidos micro- y nanoparticulados mediante microemulsiones con CO <sub>2</sub> .....                        | 143 |

|   |            |
|---|------------|
| 5.2 Precipitación confinada del ibuprofeno en microemulsiones o/w con acetona expandida con CO <sub>2</sub> .....   | 146        |
| 5.2.1 Formación de microemulsiones o/w en el sistema “ibuprofeno/acetona/agua/CO <sub>2</sub> ”.....  | 149        |
| 5.2.2 Efecto de la variación de la presión sobre microemulsiones o/w formadas por “ibuprofeno/acetona/agua/CO <sub>2</sub> ”.....                         | 152        |
| 5.3 Desarrollo de la metodología de precipitación basada en microemulsiones o/w generadas con CO <sub>2</sub> . El proceso PIWASP.....                    | 158        |
| 5.3.1 Desarrollo metodológico del proceso PIWASP por compresión.....  | 159        |
| 5.3.2 Desarrollo metodológico del proceso PIWASP por descompresión.....   | 163        |
| 5.4 Comparación de las metodologías PIWASP y DELOS de precipitación desde disoluciones expandidas con CO <sub>2</sub> .....                               | 167        |
| 5.5 Influencia de la presencia de un tensoactivo en la precipitación confinada del ibuprofeno mediante el proceso PIWASP.....                             | 169        |
| 5.5.1 Formación de microemulsiones o/w formadas por “ibuprofeno/acetona/agua/CO <sub>2</sub> ” en presencia de PEG6000.....                               | 170        |
| 5.5.2 Efecto de la variación de la presión sobre microemulsiones o/w formadas por “ibuprofeno/acetona/agua/CO <sub>2</sub> ” en presencia de PEG6000..... | 172        |
| 5.5.3 Precipitación de partículas de ibuprofeno en presencia de PEG6000 con la metodología PIWASP por compresión y descompresión.....                     | 174        |
| 5.6 Análisis de la cristalinidad de las partículas de ibuprofeno obtenidas por PIWASP.....  | 176        |
| 5.6.1 Influencia de la presencia de un tensoactivo sobre la cristalinidad de partículas obtenidas por PIWASP.....   | 178        |
| 5.7 Conclusiones.....   | 180        |
| 5.8 Referencias.....  | 182        |
| <br>  |            |
| <b>Capítulo 6</b>   |            |
| <b>Parte Experimental.....</b>  | <b>187</b> |
| 6.1 Materiales.....   | 187        |
| 6.2 Técnicas e instrumentación utilizadas para la caracterización de los materiales moleculares obtenidos.....  | 187        |

---

|   |            |
|---|------------|
| 6.2.1 Técnicas de dispersión de luz.....  | 187        |
| 6.2.2 Potencial zeta ( $\zeta$ ) .....  | 188        |
| 6.2.3 Turbidimetría.....  | 188        |
| 6.2.4 Microscopías.....   | 189        |
| 6.2.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....  | 191        |
| 6.2.6 Rayos X.....  | 191        |
| 6.2.7 Espectroscopías.....  | 192        |
| 6.3 Medidas de solubilidad en disolventes convencionales.....   | 192        |
| 6.4 Determinación de solubilidades en disolventes orgánicos expandidos con CO <sub>2</sub> ...                | 193        |
| 6.5 Datos de solubilidad descritos en la memoria.....   | 201        |
| 6.6 Densidad óptica.....  | 201        |
| 6.2.1 Densidad óptica en sistemas CTAB/colesterol.....  | 202        |
| 6.2.2 Densidad óptica a alta presión.....   | 203        |
| 6.7 Estudio del sistema vesicular CTAB/colesterol.....  | 205        |
| 6.7.1 Preparación de sistemas dispersos “CTAB/colesterol/H <sub>2</sub> O” por ultrasonidos.....              | 205        |
| 6.7.2 Estudios espectroscópicos con el cloruro de pinacianol (PIN).....                                       | 205        |
| 6.7.3 Influencia de la acetona residual en los diferentes sistemas dispersos CTAB/colesterol preparados ..... | 206        |
| 6.8 Referencias.....  | 208        |
| <b>Conclusiones.....</b>  | <b>211</b> |
| <b>Publicaciones.....</b>   | <b>213</b> |



# Capítulo 1

## Introducción y objetivos

Actualmente, existe un creciente interés en la preparación de **materiales moleculares nanoparticulados**, bien en fase sólida (nanopartículas) ó bien formando parte de un sistema disperso (suspensiones,<sup>(1)</sup> emulsiones,<sup>(2)</sup> sistemas vesiculares,<sup>(3)</sup> etc.) de manera eco-eficiente y reproducible.<sup>(4)</sup>

Un sistema disperso está formado por una fase dispersa y una fase continua o medio dispersante.<sup>(4)</sup> La fase dispersa está constituida por un soluto (sólido o líquido) dispersado en la fase continua, generalmente un medio líquido acuoso u orgánico. Las suspensiones, emulsiones, sistemas vesiculares y micelas son los sistemas dispersos más desarrollados y utilizados en la mayoría de aplicaciones industriales (aditivos, recubrimientos, alimentos, medicamentos, cosméticos). Tal y como se representa en la Figura 1.1, las suspensiones están formadas por partículas sólidas dispersas en un fluido acuoso u orgánico, estabilizadas por la acción de un tensoactivo.<sup>(1)</sup> Las emulsiones lo están por gotitas de un líquido dispersas en otro fluido con el cual no son miscibles,<sup>(2)</sup> mientras que los sistemas vesiculares lo están por estructuras esféricas cerradas constituidas por una membrana anfífilica encerrando en su interior un medio determinado.<sup>(5)</sup> Por ultimo, las micelas están formadas por agregados de moléculas de tensoactivo dispersas en un fluido acuoso u orgánico.<sup>(6)</sup>

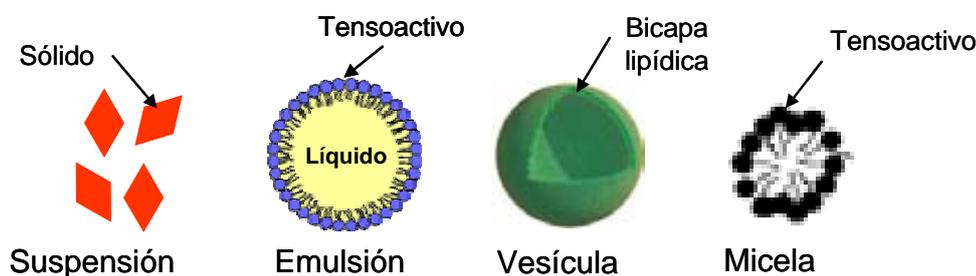


Figura 1.1. Representación de diferentes sistemas dispersos.

La investigación y el desarrollo de este tipo de **materiales moleculares nanoparticulados** está en pleno auge, ya que se ha comprobado experimentalmente que

tienen la capacidad de actuar como materiales inteligentes respondiendo a estímulos externos –cambios de temperatura o pH- , además de ser capaces de mimetizar materiales naturales específicos -músculos o células-, teniendo un amplio rango de aplicaciones que van desde su utilización como plantillas nanoscópicas para la preparación de materiales nanoestructurados hasta su empleo como vehículos para el suministro de fármacos o agentes de contraste magnético.<sup>(7)</sup> Ahora bien, el enorme potencial de los materiales moleculares descritos anteriormente, puede quedar totalmente frustrado si no se desarrollan tecnologías eficientes que permitan su preparación a escala industrial de manera robusta y respetuosa con el medio ambiente.<sup>(4)</sup>

Los métodos actuales de preparación de **materiales moleculares nanoparticulados**, basados en disolventes líquidos, a menudo no son adecuados, ya que suelen constar de muchas etapas, poseen largos tiempos de procesado, y dependen enormemente de la eficiencia del sistema de mezclado, lo que dificulta en gran medida su escalado a nivel industrial. Asimismo, estos métodos son poco reproducibles, consumen grandes cantidades de energía y disolventes orgánicos, y las características finales del producto suelen depender de las características del material de partida. Por todos estos motivos, actualmente existe un gran interés, tanto a nivel académico como industrial, en la investigación, desarrollo y aplicación de nuevos métodos de preparación **materiales moleculares nanoparticulados**, en los cuales exista un elevado control de la estructura químico-física del producto final, y que por otra parte sean eficientes (bajo consumo energético), respetuosos con el medio ambiente (menos consumo de disolventes orgánicos) y fácilmente escalables.

Durante los últimos años, los fluidos comprimidos (FCs) han despertado un interés patente, tanto a nivel básico como aplicado, como disolventes alternativos a los disolventes orgánicos, e incluso al agua, utilizados en procesos de síntesis y preparación de materiales moleculares.<sup>(8),(9)</sup> Dentro del ámbito industrial, el motor del desarrollo de las tecnologías en FCs ha sido la necesidad, impuesta por las nuevas legislaciones internacionales, de reducir las emisiones y los residuos orgánicos originados en un gran número de procesos industriales.<sup>(10)</sup> Así por ejemplo, el factor E,<sup>(12)</sup> que relaciona los residuos generados en un sector industrial con la cantidad de producto final obtenido, toma valores bastantes elevados en el caso del sector farmacéutico (25-100),<sup>(11)</sup> lo que indica que los procesos utilizados en este sector tienen un elevado impacto ambiental.<sup>(13)</sup> Así pues, en este sector es particularmente interesante el desarrollo de nuevas

tecnologías químicas verdes e innovadoras que reduzcan o eliminen el uso y la generación de sustancias dañinas para el medio ambiente y las personas.<sup>(14)</sup>

El CO<sub>2</sub> a alta presión, en estado líquido o supercrítico, es el fluido comprimido más utilizado debido a sus características de disolvente verde, que puede sustituir a los disolventes orgánicos e incluso al agua en diferentes aplicaciones.<sup>(15)</sup> Desde el punto de vista medioambiental y económico presenta características ventajosas ya que es fácilmente reciclable, no inflamable, no es tóxico para las personas ni es nocivo para el medio ambiente. También es importante el hecho de que es un componente barato que puede obtenerse fácilmente. Así, este compuesto se encuentra en reservorios naturales, es el residuo más abundante de las centrales térmicas o se obtiene como producto secundario en la producción industrial de diferentes productos químicos (amoníaco, etanol, etc.) Por otra parte, el CO<sub>2</sub> se puede reciclar, y por tanto, su uso no implica un aumento de las emisiones que contribuyen al efecto invernadero. Asimismo, el CO<sub>2</sub> puede ser fácilmente eliminado después del procesado mediante la despresurización del sistema.<sup>(16)</sup> Sin embargo, el argumento más importante que ha impulsado el desarrollo e interés de la tecnología de FCs es la bondad que han mostrado estos disolventes a alta presión para preparar materiales con características estructurales y propiedades inalcanzables mediante disolventes convencionales. Esta capacidad, es en gran medida debida a que las propiedades de los FCs (capacidad solvatadora, densidad, constante dieléctrica, etc.) pueden modificarse por cambios de presión, los cuales se transmiten de manera mucho más rápida que los cambios de temperatura y composición utilizados para gobernar procesos realizados en disolventes líquidos.<sup>(17)</sup> Así, mediante su utilización se han podido preparar sólidos finamente divididos de dimensiones micro- y nanoscópicas,<sup>(18)</sup> biomateriales nanoestructurados con porosidad controlada, y polímeros de alto peso molecular con características estructurales inalcanzables mediante procesado convencional.<sup>(19)</sup> Ahora bien, la utilización del CO<sub>2</sub> como disolvente está muy limitada por la baja solubilidad que tienen la mayoría de los compuestos orgánicos polares en este medio, incluso a presiones elevadas, debido a la baja polaridad del CO<sub>2</sub>. Por otro lado, los llamados disolventes orgánicos expandidos con CO<sub>2</sub>, formados por CO<sub>2</sub> subcrítico condensado en un disolvente orgánico, han demostrado tener una mayor capacidad para disolver compuestos polares respecto al CO<sub>2</sub> puro, y por tanto, han permitido que muchos procesos químicos se lleven cabo en unas condiciones suaves de operación, mejorándose con ello la eficiencia y coste de dichos procesos.<sup>(20)</sup> En estas mezclas subcríticas, el disolvente orgánico es

substancialmente, pero no totalmente, sustituido (hasta un 80% en volumen) por el CO<sub>2</sub>. Se ha comprobado también que los disolventes expandidos con CO<sub>2</sub> son capaces de generar un medio disolvente continuo en función de su composición y de su grado de expansión, ofreciendo un gran abanico de posibilidades en el procesado de materiales - formación de micro- y nanopartículas-, reacciones y extracciones.<sup>(21)</sup> Por ejemplo, los disolventes expandidos con CO<sub>2</sub> han sido utilizados en la metodología DELOS (*Depressurization of an Expanded Liquid Organic Solution*) para la preparación de micro- y nanopartículas de diversos productos farmacéuticos, tales como el paracetamol, aspirina, naproxeno, y ibuprofeno.<sup>(22)</sup>

## **1.1 Objetivos**

Dentro del marco del procesado de materiales con disolventes expandidos con CO<sub>2</sub>, los objetivos que se plantearon para la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Desarrollo de una metodología robusta y eficiente, basada en el uso de disolventes expandidos con CO<sub>2</sub>, para preparar sistemas dispersos (suspensiones, vesículas...) con características estructurales uniformes.
2. Estudio de la viabilidad de formar microemulsiones estables, con disolventes expandidos con CO<sub>2</sub>, para utilizarlas como plantillas en procesos de cristalización en entornos confinados.

## 1.2 Referencias

- (1) Rabinow, B.E., *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 785.
- (2) (a) Smith D.H.; Lim, K.H., *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 5, 977; (b) Heusch, R. en *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH **2003**, *11*, 678-690.
- (3) (a) Müller-Goymann, C.C., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 34. (b) Kreuter, J., Colloidal drug delivery systems, *Drugs and the pharmaceutical sciences*, Marcel DekkerInc., New York, Basel and Hong Kong **1994**, *66*, 191.
- (4) Horn, D.; Rieger, J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4330.
- (5) (a) Gregoriadis, G.; Florence, A.T.; Patel, H.M., *Liposomes in drug delivery*, Harwood Academic Publishers GmbH, Chur **1993**, 239. (b) Kreuter, J., *Colloidal drug delivery systems*, *Drugs and the pharmaceutical sciences*, Marcel DekkerInc., New York, Basel and Hong Kong **1994**, *66*, 191.
- (6) (a) Small, D.M., *The physical chemistry of lipids: from alkanes to phospholipids*, Plenum Press, New York **1986**; (b) Shinoda, K., *Solvent properties of surfactant solutions*, Surfactant science series, Marcel Dekker Inc., New York **1967**, *2*, 27
- (7) (a) Möhwald, M.; *Soft Matter* **2005**, *1*, 328; (B) Holyst, R., *Soft Matter* **2005**, *1*, 329
- (8) (a) Cansell, F.; Aymonier, C.; Loppinet-Serani, A., *Curr. Opin, Solid State Mat. Sci.* **2003**, *7*, 331; Holmes, J.D.; Lyons, D.M.; Ziegler, K.J. *Chem, Eur. J.* **2003**, *9*, 2199; (c) Woods, H.M.; Silva, M.M.C.G.; Nouvel, C.; Shakesheff, K.M.; Howdle, S.M. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 1663; (d) Lopez, J.A.; Gourgouillon, D.; Pereira, P.J.; Ramos, A.M.; Nunes Da Ponte, M., *J. Supercrit. Fluids* **2000**, *16*, 261.
- (9) Jessop, P.G.; Leietner, W., *Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids*, Wiley-VCH, **1999**.
- (10) Wells, S.L.; DeSimone, J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 518.
- (11) Sheldon, R.A. *ChemTech* **1994**, *24*, 38.
- (12) El facto E se define como la cantidad en kilogramos de subproductos de desechos generados por cada kilogramo del producto deseado obtenido.
- (13)(a) Polyakoff, M.; Fitzpatrick, J.M.; Farren T.R.; Anastas, P.T. *Science* **2002**, 297, 807. (b) DeSimone, J.M. *Science* **2002**, 297, 799.
- (14) Anastas, P.T.; Kirchhoff, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 686.
- (15)(a) Chattopadhyay, P.; Gupta, R.B., *Int. J. Pharm.*, **2001**, 228, 19, (b) Reverchon, E.; Della Porta, G., *Powder Technol.*, **1999**, *106*, 23.
- (16) Eckert, C.A.; Knurson, B.L.; Debenedetti, P.B., *Nature* **1996**, 383, 313.

- (17)(a) Fernandez, C.A.; Wai, C.M. *Small* **2006**, 2, 1266. (b) H. Ohde, C.M. Wai, H. Kim, J. kim, M. Ohde, *J. Am.Chem. Soc.* **2002**, 124, 4540.
- (18)Shekunow, B.Y.; Chattopadhyay, P.; Seitzinger, J.; Huff, R., *Pharm. Res.* **2006**, 23, 1, 196. (c) Zhang. J; Han, B.; Zhang, C.; Li, W.; Feng, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47.
- (19)(a) Jung, J.; Perrut,M., *J. Supercrit. Fluids* **2001**, 20, 179; (b) Reverchon, E.; Adami, R., *J. Supercrit. Fluids* **2006**, 37, 1, 1.
- (20)Gallagher, P.M.; Coffey. M.P.; Krukoni, V.J.; Klasutis, N. *ACS Symp. Ser.* **1989**, 406, 334. (b) Wei, M.; Musie, G.T.; Busch, D.H.; Subramaniam, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2513.
- (21)Eckert, C.A.; Bush, D.; Brown, J.S.; Liotta, C.L.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, 39, 4615.
- (22)(a) N. Ventosa, S. Sala, J. Veciana, J. Torres, J. Llibre, *Cryst. Growth Des.* 2001, 1, 299; (b) N. Ventosa, J. Veciana, C. Rovira, S. Sala, *International patent WO 0216003*, **2002**.



# Capítulo 2

## Desarrollo del proceso “DELOS-SUSP”

Actualmente, existe un creciente interés en la preparación de sistemas dispersos – suspensiones, emulsiones, vesículas, etc.- de manera eco-eficiente y reproducible, ya que son capaces de actuar como materiales inteligentes que responden a estímulos externos, y que mimetizan a determinados materiales naturales. No obstante, la utilización de estos materiales en aplicaciones reales esta estrechamente ligada a la capacidad que tengamos de prepararlos de manera robusta, eficiente y respetuosa con el medio ambiente.

Así pues, en este contexto, el principal objetivo de este capítulo será el desarrollo de un nuevo método de preparación de sistemas dispersos, concretamente de suspensiones estables y homogéneas en tamaño y morfología, basado en el método de precipitación DELOS con fluidos comprimidos.<sup>(1)</sup>

### 2.1 Suspensiones

Una suspensión es un sistema disperso formado por partículas sólidas dispersas en un fluido acuoso ú orgánico, estabilizadas por la acción de un tensoactivo (ver Figura 2.1). El tamaño de la fase dispersa en una suspensión puede estar comprendido entre varios nanómetros (nanosuspensiones) hasta micras (microsuspensiones). En la actualidad, las suspensiones son utilizadas en un rango amplio de aplicaciones, por ejemplo, en la preparación de aditivos, recubrimientos, alimentos, fármacos y cosméticos. En algunas de estas aplicaciones, la obtención de suspensiones con tamaños micro- y nanométricos de la fase dispersa puede comportar un aumento notable de las ventajas competitivas de este tipo de sistemas. Por ejemplo, la preparación de nanosuspensiones de sustancias de elevada actividad terapéutica, pero de baja solubilidad en agua, son interesantes para el sector farmacéutico, ya que podrían permitir el suministro de dichas sustancias por vía intravenosa o transdermal, favoreciendo su biodisponibilidad y reduciendo su toxicidad. Además, esto supondría un gran aumento de la estabilidad de estos sistemas dispersos en el tiempo, lo que

facilitaría su transporte y distribución, permitiendo llevar a cabo campañas masivas de vacunación.<sup>(2)</sup>

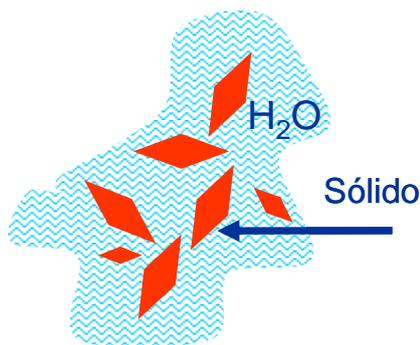


Figura 2.1. Esquema de una suspensión

### 2.1.1 Métodos de preparación de suspensiones

Existen básicamente dos estrategias para la preparación de suspensiones en fases acuosas, la descendente (“top-down”) y la ascendente (“bottom-up”). En una estrategia descendente las dimensiones micro- y nanoscópicas de la fase sólida de la suspensión, se alcanzan a partir de la desintegración del material, mientras que en una estrategia ascendente el material particulado disperso se forma por el ensamblaje de sus unidades constitutivas, como por ejemplo las moléculas (ver Figura 2.2).<sup>(3)</sup>

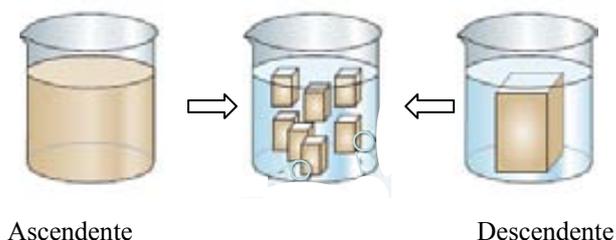


Figura 2.2. Preparación de suspensiones mediante estrategias ascendentes y descendentes

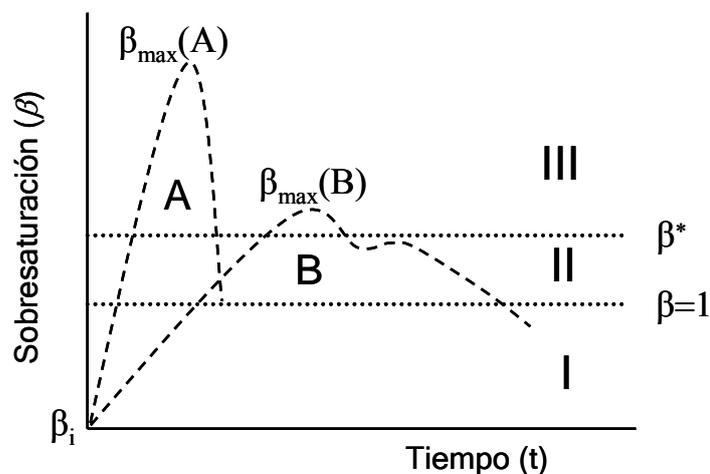
Los métodos que siguen una estrategia descendente para preparar sistemas dispersos, están basados en procesos de desintegración de materiales sólidos en forma de partículas,<sup>(4)</sup> bien sea por vía seca (“air jet milling”) o por vía húmeda (“pearl milling”, “high-pressure homogenization”). Estos métodos presentan numerosos inconvenientes a la hora de preparar una suspensión, ya que a menudo se producen contaminaciones del sistema por metales y existe una elevada dependencia con las características del material de partida.<sup>(5)</sup> Además con ellos se tiene un bajo control sobre algunas de las características de la fase dispersa (morfología y cristalinidad) y requieren

un elevado consumo energético.<sup>(6)</sup> Asimismo, este tipo de procesado puede afectar las propiedades físicas y químicas del material, tales como su fluidez, carga, tendencia a la aglomeración, reactividad química, cristalinidad y estabilidad fisicoquímica.<sup>(7)</sup>

En una estrategia ascendente, la conversión de la disolución homogénea de las moléculas en sistemas dispersos se realiza empleando procesos de precipitación, emulsión, o condensación. Hasta la fecha, la metodología ascendente más utilizada ha sido la de *precipitación*, basada en la disolución del compuesto a dispersar en un disolvente, y la adición de esta disolución sobre una nueva fase líquida acuosa en la cual el compuesto no es soluble.<sup>(8)</sup>

En cualquier proceso de cristalización o precipitación desde una disolución, el compuesto a cristalizar pasa de estar disuelto en el medio a formar una nueva fase sólida dispersa en un medio líquido. El grado de sobresaturación ( $\beta$ ), definido como la relación entre la concentración real del soluto a cristalizar en la disolución ( $C$ ) respecto a su concentración de saturación o solubilidad ( $C_S$ ), es la fuerza por la cual se rigen los fenómenos de nucleación y crecimiento cristalino en una cristalización. En este sentido, el rendimiento de una cristalización y las características de las partículas formadas (distribución de tamaños, morfología, cristalinidad, naturaleza polimórfica, etc.) dependerán enormemente de la evolución del perfil de sobresaturación  $\beta$  a lo largo del tiempo, y del grado de homogeneidad de este perfil en todos los puntos de la disolución. En el gráfico de la Figura 2.3 están representadas, de manera cualitativa, los perfiles de sobresaturación de dos procesos de cristalización distintos. Las tres zonas que se distinguen en este gráfico, denominadas como zona I, II y III, corresponden a áreas en las cuales la sobresaturación de la disolución toma diferentes valores a lo largo del tiempo. Así, la zona I corresponde a valores de sobresaturación inferiores a la unidad, en la cual el compuesto se encuentra en disolución. En la zona II, el valor de  $\beta$  es superior a la unidad e inferior al valor de sobresaturación crítico  $\beta^*$ ; valor a partir del cual se favorece el fenómeno de nucleación. En esta última zona de naturaleza metaestable puede darse el crecimiento cristalino pero no la creación de nuevos núcleos. Este hecho comporta que si no se ha producido previamente una nucleación, o no hay en el medio ningún tipo de partícula o elemento sólido a partir del cual se pueda iniciar el crecimiento cristalino, el soluto se mantendrá en disolución. Finalmente, la zona III corresponde a aquellos valores de  $\beta$  más grandes que  $\beta^*$ , en la cual se dan los fenómenos de nucleación y crecimiento cristalino. Dentro de esta zona, y en el caso de

tener valores de  $\beta$  muy elevados, se puede dar el fenómeno denominado de nucleación catastrófica.<sup>(9)</sup>



**Figura 2.3.** Trazo A: Perfil cualitativo de la sobresaturación correspondiente a un proceso de cristalización donde el fenómeno de nucleación se encuentra favorecido respecto al proceso de crecimiento cristalino. Trazo B: Perfil cualitativo de la sobresaturación correspondiente a un proceso donde el crecimiento cristalino está favorecido respecto a la nucleación.

El perfil de sobresaturación de un proceso de cristalización se define mediante una serie de parámetros. Estos parámetros son el grado de sobresaturación inicial del soluto antes de la cristalización ( $\beta_i$ ), el valor de sobresaturación máximo alcanzado durante el proceso de cristalización ( $\beta_{\max}$ ), y la velocidad de la variación de la sobresaturación ( $\delta\beta/\delta t$ ). Los valores de  $\beta_{\max}$  y  $\delta\beta/\delta t$  alcanzados durante una cristalización dependen de la intensidad de la fuerza promotora del incremento de la sobresaturación (enfriamiento de la disolución, efecto antisolvente de un nuevo componente añadido a la disolución, reacción química que genere un nuevo producto que precipite, etc.). En aquellos procesos de cristalización con  $\delta\beta/\delta t$  más grandes que la velocidad de nucleación, y donde se alcancen rápidamente elevados valores de  $\beta_{\max}$ , como es en el caso del proceso que transcurre según el perfil A de la Figura 2.3, el fenómeno de nucleación se verá favorecido sobre el fenómeno de crecimiento cristalino, de manera que la sobresaturación generada será mayoritariamente consumida por la formación de nuevos núcleos, y en menor grado por el crecimiento de éstos. El tipo de nucleación que se da en este caso es la *nucleación primaria*, lo que significa que los núcleos aparecen en un medio donde no hay ningún tipo de materia cristalina, y *homogénea*, lo que indica que no ha sido inducida por partículas foráneas. Este tipo de

comportamiento da lugar a la precipitación de solutos en forma de partículas muy pequeñas. Asimismo, si el perfil de sobresaturación alcanzado en todos los puntos de la disolución es muy homogéneo, se obtendrán partículas con distribuciones de tamaño estrechas. Por otro lado, si el proceso de cristalización sigue un perfil de  $\beta$ , parecido al observado en el perfil B de la Figura 2.3, en el cual  $\delta\beta/\delta t$  es más baja y se alcanzan valores de  $\beta_{\max}$  más pequeños, la sobresaturación generada será consumida por ambos mecanismos de nucleación y crecimiento cristalino, y en mayor grado por el segundo, lo que conduce a la formación de cristales con una amplia distribución de tamaños de partícula. En este perfil, el tipo de nucleación que se puede dar durante la cristalización puede ser tanto primaria como secundaria. La nucleación secundaria se produce en la superficie de los cristales presentes en el sistema sobresaturado, y contribuye a aumentar el tamaño de partícula y a ampliar la distribución de tamaños. Por tanto, en base a estas condiciones, se puede decir que en cualquier proceso de preparación de suspensiones ascendente, basado en una precipitación desde una disolución, las características de la fase dispersa (distribución de tamaño, morfología, polimorfismo, cristalinidad, etc.) dependerán de la evolución del perfil de sobresaturación ( $\beta$ ) a lo largo del tiempo, y de su homogeneidad en todos los puntos del sistema.

La metodologías de preparación de suspensiones basadas en procesos de precipitación desde líquidos presentan numerosas limitaciones, por ejemplo, baja reproducibilidad, elevado consumo energético, largos tiempos de procesado, y control limitado sobre las características estructurales del material final. Estos inconvenientes son consecuencia de que en un método de precipitación basado en disolventes líquidos, los perfiles de sobresaturación,  $\beta=f(t)$ , están gobernados por cambios de composición y temperatura, los cuales se transmiten de manera lenta y poco homogénea en un medio líquido. Por tanto, en este tipo de metodologías basadas en disolventes líquidos, la homogeneidad de los perfiles de sobresaturación en todo el sistema dependerá enormemente de la eficiencia del sistema de mezclado empleado, dificultando en gran medida su escalado a nivel industrial. Los métodos de precipitación convencionales conducen a suspensiones con tamaños de la fase dispersa grandes y poco homogéneos, siendo necesarias etapas adicionales de trituración y micronización, para alcanzar los tamaños micro- y nanoscópicos deseados.

Así pues, los procedimientos que se siguen actualmente para preparar micro- y nanosuspensiones constan de muchas etapas, son muy sofisticados y difíciles de escalar, requieren sistemas de agitación muy eficientes, consumen grandes cantidades de energía

y son poco reproducibles. Por todos estos motivos, existe un gran interés, tanto a nivel académico como industrial, en la investigación, desarrollo y aplicación de nuevos métodos de preparación de dispersiones, los cuales permitan un mayor control de la estructura fisicoquímica del producto final, sean eficientes (bajo consumo energético), respetuosos con el medio ambiente (bajo consumo de disolventes orgánicos), fácilmente escalables y generen pocos residuos.

### 2.1.2 Preparación de suspensiones con fluidos comprimidos

Durante estos últimos años, los fluidos comprimidos (FCs) bien en estado líquido ó supercrítico, están siendo investigados, tanto a nivel básico como aplicado, como disolventes alternativos a los convencionales en la preparación de suspensiones, debido a sus características de disolvente verde.<sup>(10),(11)</sup>

Así, en la última década se han desarrollado diversos procesos para la preparación de suspensiones basados en la técnica ascendente de cristalización y en el uso de FCs. Buena parte de estos procesos de cristalización tienen en común el uso del dióxido de carbono como fluido comprimido, y el objetivo final es el de obtener suspensiones con partículas micro- o nanoscópicas, y una distribución de tamaños lo más estrecha posible.<sup>(12)</sup>

Tal y como se ha mencionado en el Capítulo 1, los fenómenos de transferencia de masa en los fluidos comprimidos están más favorecidos que en los disolventes líquidos convencionales, pudiéndose realizar más fácilmente cambios bruscos de su capacidad solvatadora. Así por tanto, en los procesos de cristalización basados en el uso de FCs, se pueden conseguir valores elevados de  $\beta_{\max}$  en espacios de tiempo muy pequeños, favoreciendo con ello el fenómeno de nucleación sobre el de crecimiento cristalino, y la obtención de micro- o nanosuspensiones muy homogéneas en tamaño y morfología.

Y.-P. Sun et al. fueron los primeros en desarrollar una metodología con FCs para la preparación de suspensiones de solutos hidrofóbicos en fases acuosas, a la cual denominaron RESOLV (*Rapid Expansion of a Supercritical Solution into a Liquid Solvent*).<sup>(13)</sup> Esta metodología, basada en el método de precipitación RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solutions*),<sup>(14)</sup> consiste en la disolución del compuesto a precipitar en CO<sub>2</sub> para formar una disolución supercrítica y su posterior despresurización sobre una fase acuosa. Esta metodología presenta varias limitaciones,

entre ellas, la necesidad de materiales de partida apolares, la poca cantidad de material que puede ser procesado por lote, y las elevadas presiones de trabajo (>20MPa). Este método ha sido utilizado, por ejemplo, para la preparación de nanosuspensiones de poliheptafluorodecilacrilatos,<sup>(15)</sup> de proteínas conjugadas con sulfuro de plata,<sup>(16)</sup> y de nanopartículas de plata.<sup>(17)</sup>

Por otro lado, T.M. Martin et al. han desarrollado un método de obtención de nanosuspensiones, basado en el método de precipitación PCA (*Precipitation with a compressed Antisolvent*) donde el CO<sub>2</sub> actúa como antisolvente.<sup>(18)</sup> Este método consiste en la disolución del compuesto a precipitar en un disolvente orgánico convencional, y la inyección de esta disolución sobre un reactor lleno de CO<sub>2</sub> a alta presión, donde tiene lugar simultáneamente la precipitación del compuesto y su estabilización sobre una disolución acuosa. La preparación de sistemas particulados mediante esta técnica es complicada, ya que en este caso la precipitación se da a alta presión, y por lo tanto, se necesitan equipamientos muy complejos para mezclar adecuadamente a estas condiciones el material micro y/o nanoparticulado y la fase acuosa dispersante. Esta técnica ha sido utilizada, por ejemplo, para la preparación de nanosuspensiones de glucocorticoides, tales como la budesonida empleada en el tratamiento de enfermedades de tipo respiratorio.<sup>(19)</sup>

Las tecnologías existentes de obtención de suspensiones, basadas en procesos de precipitación con CO<sub>2</sub>, son difíciles de llevar a escala industrial, ya que requieren presiones de trabajo elevadas y equipamientos muy complejos. Por lo tanto, no existe todavía una tecnología que permita preparar micro- y nanosuspensiones homogéneas en tamaño y morfología, de forma reproducible, en una sola etapa de procesado y a bajas presiones.

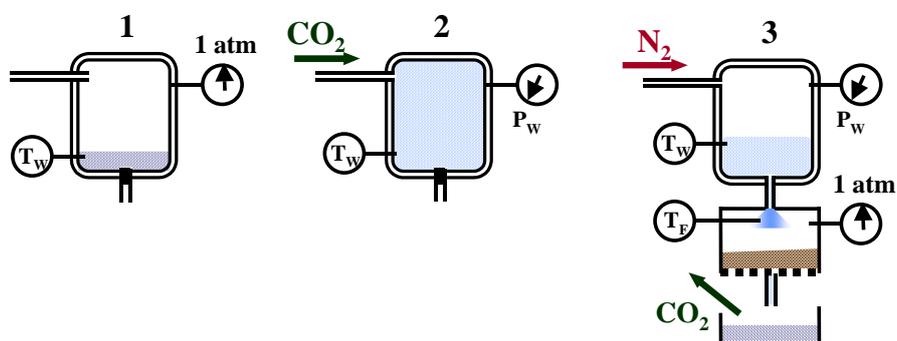
## **2.2 Desarrollo del nuevo método de preparación de suspensiones basado en la tecnología DELOS**

### **2.2.1 Introducción al proceso DELOS**

El proceso DELOS (*Depressurization of an Expanded Liquid Organic Solution*),<sup>(1)</sup> desarrollado por el grupo donde se ha realizado la presente Tesis Doctoral, permite obtener en una sola etapa de procesado materiales moleculares sólidos micro- y

nanoparticulados con estrechas distribuciones de tamaño de partícula y con organizaciones supramoleculares homogéneas.

En un proceso de cristalización DELOS (ver Figura 2.4), la adición de un fluido comprimido, generalmente  $\text{CO}_2$ , sobre una disolución orgánica que contiene el soluto a cristalizar genera una nueva disolución líquida expandida. Esta nueva disolución líquida está constituida por el soluto disuelto en una mezcla “disolvente orgánico/ $\text{CO}_2$ ” a unas condiciones de presión,  $P_w$ , y temperatura,  $T_w$ . A diferencia de otros métodos de precipitación, en el método DELOS el  $\text{CO}_2$  no provoca en esta etapa la precipitación del soluto que se encuentra disuelto, sino que actúa como cosolvente.<sup>(1)</sup> Cuando esta disolución a alta presión se despresuriza, el  $\text{CO}_2$  se evapora, provocando un enfriamiento rápido y extremadamente homogéneo del sistema.<sup>(20)</sup> Este enfriamiento homogéneo, provoca un gran aumento de la sobresaturación de igual magnitud en todos los puntos de la disolución, favoreciendo los fenómenos de nucleación frente a los de crecimiento cristalino y por tanto, la precipitación de sólidos particulados de tamaño micro- o nanométrico con una distribución de tamaños estrecha.



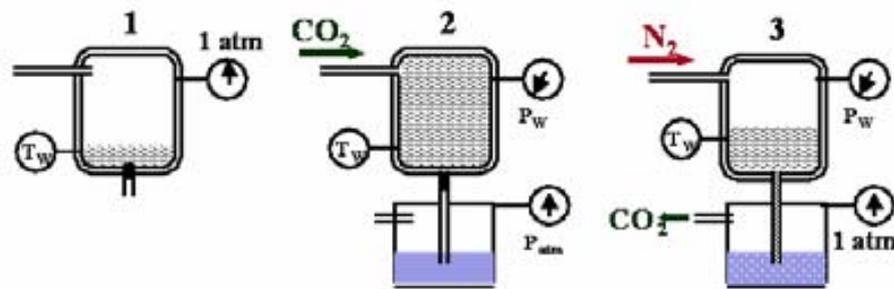
**Figura 2.4.** Etapas del proceso DELOS: (1) Adición al reactor una disolución líquida del compuesto a micronizar. (2) Adición de  $\text{CO}_2$  para obtener una disolución líquida voluméricamente expandida, a una presión,  $P_w$ , temperatura,  $T_w$ , y fracción molar de  $\text{CO}_2$ ,  $X_{\text{CO}_2}$ , determinadas. (3) Rápida reducción de la presión de la disolución líquida expandida con  $\text{CO}_2$ , desde la presión de trabajo hasta presión atmosférica, a través de una válvula anti-retorno, con la consiguiente precipitación de partículas de tamaño micro- y/o nanométrico en un filtro.

Así, en la presente Tesis Doctoral, se planteó que el proceso DELOS podría ser una tecnología muy interesante como punto de partida para el desarrollo de un nuevo método de preparación de suspensiones, debido a que con el se tiene un gran control de los fenómenos de nucleación y crecimiento de las partículas suspendidas, y además es

un proceso robusto, donde las condiciones de trabajo son relativamente bajas (5-10MPa) y la formación de las partículas se da a presión atmosférica.

### 2.2.2 Desarrollo del nuevo proceso DELOS-SUSP para la preparación de suspensiones

En la presente Tesis Doctoral se ha desarrollado una nueva metodología, denominada DELOS-SUSP, para la obtención de suspensiones, basada en una modificación del método de precipitación DELOS. La principal diferencia entre ambos procesos de precipitación es el elemento sobre el cual se lleva a cabo la despresurización de la disolución expandida con  $\text{CO}_2$ . En el proceso DELOS se hace sobre un filtro a presión atmosférica, mientras que en el proceso DELOS-SUSP se hará sobre un volumen determinado de una fase acuosa. Así pues, la obtención de suspensiones mediante un proceso basado en DELOS se planteó, tal y como se esquematiza en la Figura 2.5:



**Figura 2.5.** Etapas del proceso DELOS-SUSP: (1) Adición al reactor una disolución líquida del compuesto a micronizar. (2) Adición de  $\text{CO}_2$  para obtener una disolución líquida volumetricamente expandida, a una presión,  $P_w$ , temperatura,  $T_w$ , y fracción molar de  $\text{CO}_2$ ,  $X_{\text{CO}_2}$ , determinadas. (3) Rápida reducción de la presión de la disolución líquida expandida con  $\text{CO}_2$ , desde la presión de trabajo hasta presión atmosférica, a través de una válvula anti-retorno, sobre un determinado volumen de una fase acuosa.

Para llevar a cabo la preparación de suspensiones mediante el proceso DELOS-SUSP, era necesario encontrar sistemas modelo “soluto/disolvente orgánico/FC” que cumplieran los siguientes requisitos:

1. El FC debía ser miscible con la disolución inicial del soluto a dispersar (comportamiento cosolvente).
2. El soluto debía ser insoluble o ligeramente soluble en agua.

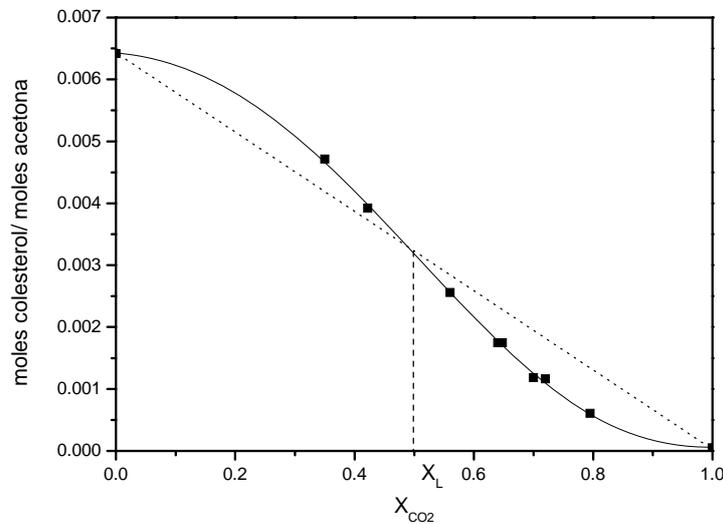
3. El soluto debía ser soluble en alguna mezcla “disolvente orgánico/FC” con un contenido en FC,  $X_{FC} > 0,4$ .

Para estudiar la bondad de esta metodología y para preparar suspensiones, se escogió como molécula modelo el coles-5-en-3 $\beta$ -ol, comúnmente denominado como colesterol. El colesterol es un lípido funcional natural,<sup>(21)</sup> prácticamente insoluble en agua, que se encuentra en la bilis, el cerebro, y en el tejido intersticial del testículo, etc. Este compuesto es un esterol, cuyo núcleo está formado por un ciclopentanoperhidrofenantreno que posee un grupo funcional hidróxido situado sobre el carbono 3. La molécula tiene aproximadamente una dimensión de 20Å de longitud y de 7Å de anchura por 5Å de espesor. Los lípidos funcionales, tales como los esteroides, carotenoides, ácidos grasos  $\omega$ -3, antioxidantes naturales y otros numerosos compuestos, son ampliamente usados como ingredientes activos en productos alimenticios, cosméticos y farmacológicos. Sin embargo, la baja solubilidad en agua que presentan estos lípidos funcionales, hace que su uso sea problemático en la preparación de estas formulaciones. La mayoría de los lípidos funcionales son casi insolubles o muestran una solubilidad muy baja en agua, lo que se traduce en una reducción de su biodisponibilidad. Por ello, la preparación de micro- y nanosuspensiones de estos lípidos funcionales, con un rango de tamaños nanométrico, puede ser una de las soluciones más interesantes para mejorar su biodisponibilidad.

Por otro lado, en nuestro grupo de investigación, ya se había procesado el colesterol como sólido con tamaño de partícula microscópico por el método DELOS, y se disponía por tanto de bastante conocimiento sobre sus propiedades y características. Además de todos estos antecedentes, es importante decir que el colesterol es un compuesto relativamente barato, lo que nos ha permitido hacer numerosos ensayos, y es un producto de fácil manejo, del que no se deben esperar efectos tóxicos si su manipulación es adecuada. Además, existen precedentes en la utilización del colesterol como compuesto modelo en otras tecnologías de preparación de sistemas dispersos, como por ejemplo, liposomas.

La viabilidad de utilizar la tecnología DELOS-SUSP para preparar suspensiones de colesterol, estaba estrechamente ligada a la existencia de una mezcla “disolvente orgánico/CO<sub>2</sub>” en la cual este lípido fuese soluble. Por ello, en el presente trabajo, se creyó conveniente determinar mediante la técnica del punto evanescente descrita en la

Parte Experimental, la solubilidad del colesterol en distintas mezclas “acetona/CO<sub>2</sub>” a  $P_w=10\text{MPa}$  y  $T_w=293\text{K}$  (ver Figura 2.6).<sup>(22)</sup>



**Figura 2.6.** Valores de solubilidad del colesterol en mezclas “acetona/CO<sub>2</sub>” a  $P_w=10\text{MPa}$  y  $T_w=308\text{K}$  medidos con un analizador de fases a alta presión a partir del método del punto evanescente (■); Ajuste realizado para visualizar la evolución de la solubilidad (□□); Variación de la solubilidad según un proceso de dilución ideal (---).

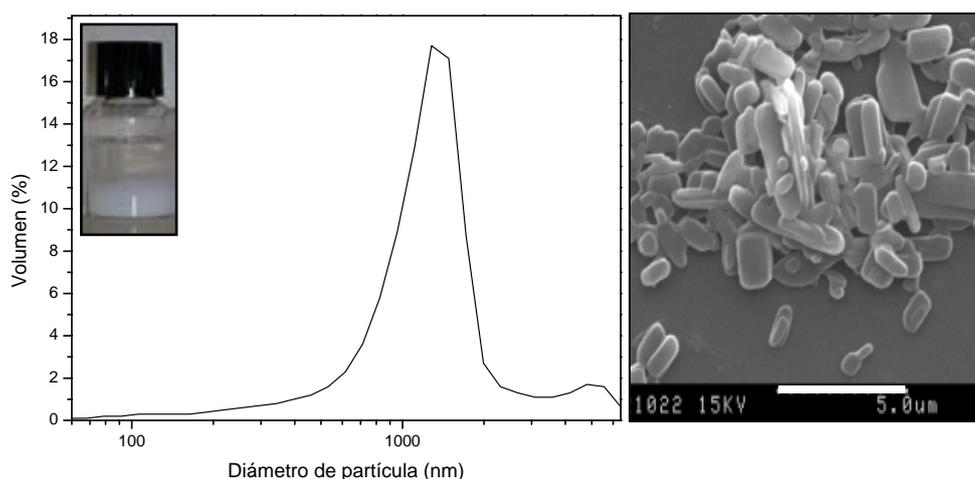
De los datos de solubilidad representados en la Figura 2.6, se desprende que el CO<sub>2</sub> tiene un fuerte carácter cosolvente en el sistema “colesterol/acetona/CO<sub>2</sub>”. La concentración de CO<sub>2</sub> límite,  $X_L$ , a partir de la cual el CO<sub>2</sub> tiene un efecto antisolvente se determina a partir del punto de intersección entre la curva de solubilidad del colesterol y la variación lineal ideal de la solubilidad con la fracción molar de CO<sub>2</sub>,  $X_{CO_2}$ . Tal y como se puede observar en la Figura 2.6, el carácter antisolvente del CO<sub>2</sub> sobre el sistema “colesterol/acetona/CO<sub>2</sub>” no se manifiesta hasta valores superiores a 0,5. Así pues, este sistema pareció adecuado para estudiar la viabilidad de la tecnología DELOS-SUSP para preparar micro- y nanosuspensiones.

### 2.2.3 Preparación de suspensiones de colesterol por DELOS-SUSP

Siguiendo el procedimiento esquematizado en la Figura 2.5, se llevo a cabo la preparación de suspensiones de colesterol en una fase acuosa. Para ello, dentro de un reactor a alta presión se adicionó 160mL de una disolución de colesterol en acetona, con una sobresaturación inicial de  $\beta_i=0,9$ , a presión atmosférica y a la temperatura de trabajo

de  $T_w=298\text{K}$ . En una segunda etapa se adicionó  $\text{CO}_2$  en el reactor para conseguir una disolución líquida volumetricamente expandida a la presión de  $P_w=10\text{MPa}$  y a la temperatura de  $T_w=308\text{K}$ , con una fracción molar de  $\text{CO}_2$ ,  $X_{\text{CO}_2}=0,5$ . Por último, dicha disolución expandida fue despresurizada hasta presión atmosférica, a través de una válvula anti-retorno, sobre 1500mL de fase acuosa.

El sistema disperso obtenido se caracterizó por las técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS), potencial zeta ( $\zeta$ ) y por microscopía electrónica de barrido (SEM) siguiendo los procedimientos descritos en la Parte Experimental. Tal y como se muestra en la Figura 2.6, el sistema disperso resultante estaba formado por una suspensión de partículas de colesterol en agua muy inestable, lo cual se explica por su bajo valor del potencial zeta obtenido (+15,3mV). Dichas partículas presentan una morfología homogénea tipo prismático y una curva de distribución de tamaños de partícula centrada en 1100 nm con un índice de uniformidad del 31,9%.

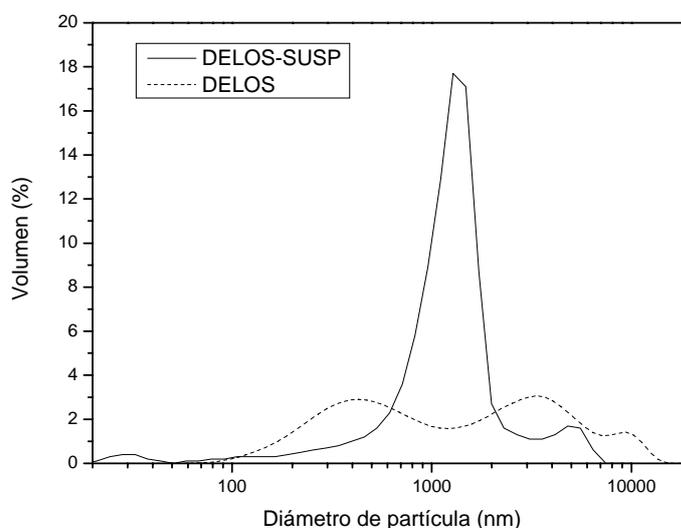


**Figura 2.6.** Curva de distribución de tamaños de partícula (izquierda) e imagen de SEM (derecha) de una suspensión de colesterol en agua obtenida mediante el proceso DELOS-SUSP.

Este resultado, muestra la capacidad de esta nueva metodología para obtener microsuspensiones de colesterol con una elevada homogeneidad en su morfología. La fuerza promotora de la precipitación en el método DELOS-SUSP, es por un lado el rápido y extremadamente homogéneo descenso de temperatura experimentado por la disolución expandida con  $\text{CO}_2$  al ser despresurizada, y por otro el fuerte carácter antisolvente del agua donde tiene lugar la dispersión. Este descenso de temperatura, es causado por la evaporación del  $\text{CO}_2$  desde la disolución expandida.<sup>(20)</sup> Como el  $\text{CO}_2$  se encuentra perfectamente disuelto con el resto de componentes del sistema

“colesterol/acetona”, su evaporación se da con la misma extensión en cualquier punto de la disolución, causando un descenso abrupto de la temperatura y un gran aumento de la sobresaturación de la disolución ( $\beta \gg 1$ ) de manera muy homogénea en el tiempo y en el espacio, favoreciendo así el fenómeno de la nucleación frente al de crecimiento cristalino,<sup>(8)</sup> y por lo tanto, la obtención de suspensiones homogéneas. Por otra parte, al ser la acetona soluble en el agua, cuando tiene lugar la despresurización, la acetona entra en contacto el agua y ésta manifiesta su carácter antisolvente coadyuvando a la precipitación. Así pues, desde el punto de vista del mecanismo del proceso, se cree que el agua puede actuar como inhibidor del crecimiento de las partículas, al ser el colesterol prácticamente insoluble en este medio, favoreciendo así la obtención de sistemas dispersos de tamaño micrométrico.

Esta hipótesis explicaría porqué el proceso DELOS-SUSP permite obtener suspensiones de colesterol con tamaños de partícula inferiores a los tamaños de partícula obtenidos para el mismo soluto en forma sólida, mediante el proceso DELOS, y con índices de uniformidad superiores (ver Figura 2.7).



**Figura 2.7.** Curva de distribución de tamaños de partícula de la suspensión de colesterol en agua obtenida mediante el proceso DELOS-SUSP (—); Curva de distribución de tamaños de partícula del colesterol sólido obtenido por el proceso de precipitación DELOS (---).

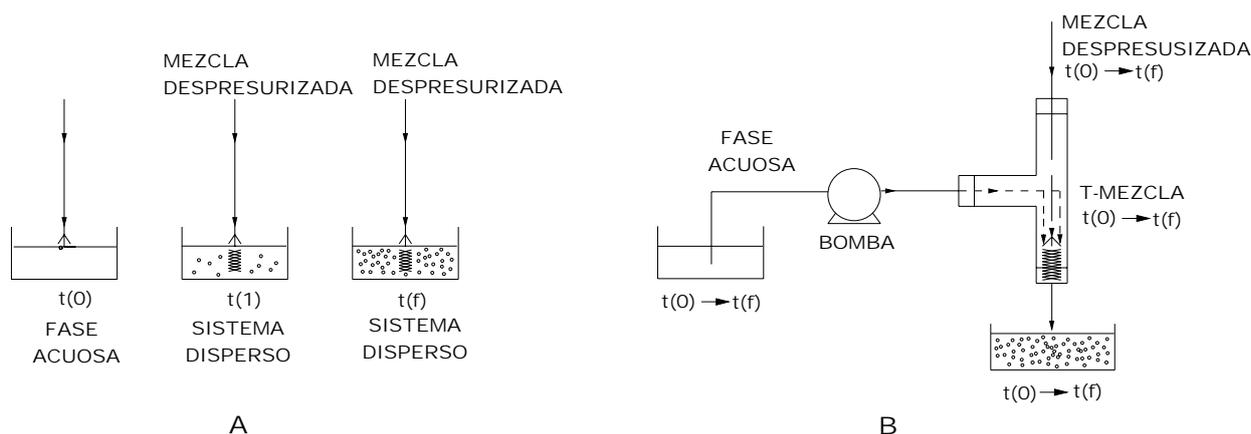
#### 2.2.4 Desarrollo tecnológico del proceso DELOS-SUSP: equipamiento y protocolo de operaciones

Como se ha comentado en el apartado anterior, es muy probable que en el proceso DELOS-SUSP las características del sistema disperso final vengan

determinadas en gran medida por el descenso de temperatura experimentado durante la despresurización de la disolución expandida y por el carácter inhibitor de la fase acuosa sobre el crecimiento cristalino de la fase dispersa. Tal y como ocurre en el proceso DELOS, el descenso de temperatura experimentado en un proceso DELOS-SUSP debería ser independiente de la escala a la que se realice el proceso, y no debe depender del caudal al cual se despresuriza la disolución expandida.<sup>(20)</sup> Así pues, en el presente trabajo se optimizó la operación de mezclado entre la disolución despresurizada y la fase acuosa, para asegurar que ésta fuera lo más reproducible posible y evitar problemas de escalado.

Para alcanzar este objetivo, se diseñó y construyó un sistema de mezclado, basado en una unión tipo T, para que la puesta en contacto entre la disolución despresurizada proveniente del reactor y la fase acuosa, se diera en un espacio muy reducido, de forma continua, y en condiciones turbulentas, aumentando de esta manera la efectividad del mezclado, y facilitando el escalado del proceso, sin que ello afectara a las características del sistema disperso final.

La eficiencia de ese sistema de mezclado fue analizada mediante la comparación de las características de dos suspensiones de colesterol en fases acuosas preparadas siguiendo la misma metodología, pero con distinto sistema de mezcla: 1) a través del mezclado de la disolución despresurizada sobre un volumen de fase acuosa (Figura 2.8A) y 2) el sistema de mezclado de unión tipo T (Figura 2.8B).



**Figura 2.8.** Esquema de los sistemas de mezclado empleados en (A) Volumen y (B) Unión tipo T.

La comparación entre los dos sistemas de mezclado se realizó experimentalmente utilizando el sistema “colesterol/acetona/agua/CO<sub>2</sub>”. En estos experimentos se despresurizó una disolución de colesterol en acetona expandida con

CO<sub>2</sub> sobre un determinado volumen de fase acuosa. En la Tabla 2.1 están recogidos los parámetros operacionales empleados en los dos experimentos realizados y las características estructurales de las suspensiones finales obtenidas.

**Tabla 2.1.** Influencia del método de mezclado entre la disolución despresurizada y la fase acuosa en la preparación de suspensiones de colesterol mediante DELOS-SUSP.<sup>h</sup>

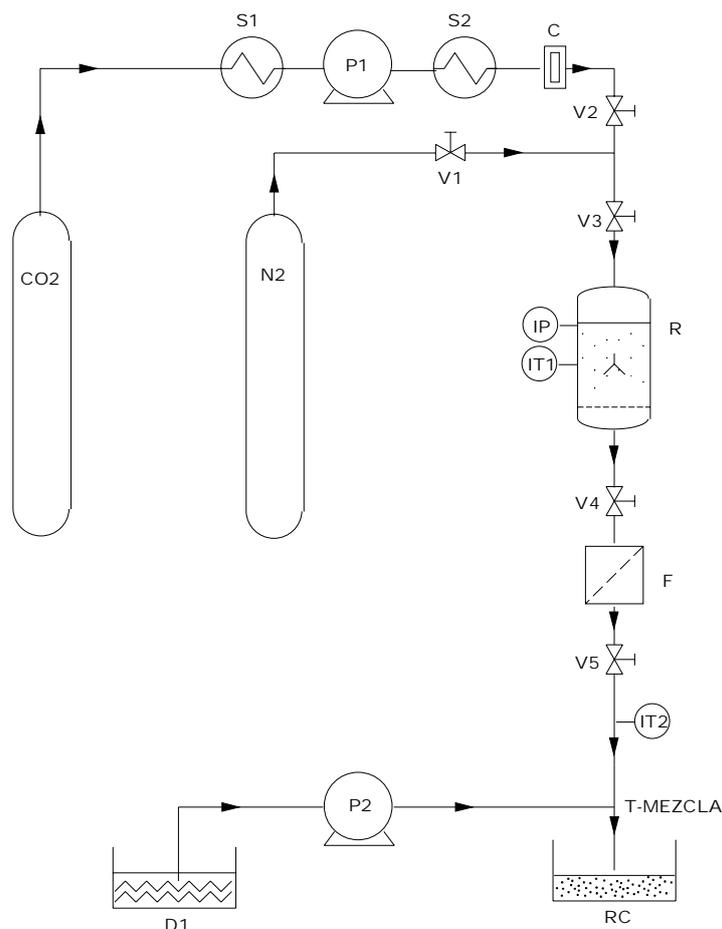
| Experimento | Mezclado             | X <sub>CO2</sub> | ΔT <sup>a</sup><br>(°C) | Rendimiento <sup>b</sup><br>(%) | Tamaño                      |                          | Estabilidad            |         |
|-------------|----------------------|------------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------|------------------------|---------|
|             |                      |                  |                         |                                 | D(0,5) <sup>c</sup><br>(nm) | I,U, <sup>d</sup><br>(%) | ζ <sup>e</sup><br>(mV) | Estable |
| NS13        | Volumen <sup>f</sup> | 0,54             | -40                     | 85                              | 1100                        | 31,9                     | +15,3                  | No      |
| NS56        | Unión T <sup>g</sup> | 0,62             | -54                     | 84                              | 873                         | 44,7                     | +27,6                  | No      |

[a] Descenso de temperatura medido durante la despresurización. [b] Rendimiento del proceso en %; [c] Diámetro medio de partícula en volumen. [d] Índice de uniformidad de la muestra %. [e] Potencial zeta. [f] Mezclado por adición del volumen total de disolución despresurizada sobre el volumen total de fase acuosa. [g] Mezclado en continuo mediante una unión tipo T de un flujo de la disolución despresurizada sobre un flujo de fase acuosa. [h]. Condiciones de operación: P<sub>w</sub>=10MPa, T<sub>w</sub>=308K, β<sub>i</sub> =0,9.

Los resultados de la Tabla 2.1 muestran que la suspensión de colesterol (NS56) obtenida a través de un sistema de mezclado unión tipo T, presenta una curva de distribución de tamaños de partícula más estrecha y con un tamaño medio inferior a los observados para la suspensión (NS13), preparada mediante el mezclado de los volúmenes totales. Respecto a la estabilidad, se puede decir que ambos sistemas son inestables, ya que presentan valores de potencial zeta inferiores a +30mV, siendo ligeramente más estable la suspensión obtenida a través de la unión tipo T. Las diferencias observadas en las suspensiones de colesterol obtenidas, confirman la importancia que tiene el sistema de mezclado en la preparación de un sistema disperso. Efectivamente, tal y como se observa en la Figura 2.8, en el sistema de mezclado unión tipo T, las características de la suspensión se mantienen constantes a lo largo del tiempo, y no dependen del volumen de sistema disperso a preparar (Figura 2.8B). Esto es debido probablemente a que en dicha unión tipo T, la puesta en contacto entre las corrientes de la disolución despresurizada y la acuosa se da de forma rápida y turbulenta, aumentando de esta manera la efectividad del mezclado, asegurando que la relación de mezcla entre ambas se mantenga constante a lo largo de toda despresurización, favoreciéndose así la obtención de suspensiones homogéneas en tamaño y morfología, independientemente de la escala del proceso. Por el contrario, cuando se mezcla la disolución despresurizada sobre el volumen total de fase acuosa

(Figura 2.8A), las características del sistema disperso varían con el tiempo, ya que para cada instante de la despresurización, una determinada fracción de la disolución orgánica expandida con CO<sub>2</sub> se despresuriza sobre todo el volumen de la fase acuosa, lo que se traduce en una disminución de la homogeneidad de la suspensión, que dependerá considerablemente de la escala a la que se realice el proceso.

En base a los resultados descritos anteriormente, la configuración experimental que se diseñó para llevar a cabo un proceso DELOS-SUSP, es la que está representada en la Figura 2.9. En esta configuración, el CO<sub>2</sub> líquido es bombeado a través de una bomba de alta presión, *PI*, previamente enfriado por un intercambiador de calor *SI* para evitar problemas de cavitación. Antes de entrar en el reactor de alta presión *R* de 300mL, el CO<sub>2</sub> se calienta a la temperatura deseada de trabajo mediante el intercambiador de calor *S2*. La medida del caudal másico de CO<sub>2</sub> introducido en el reactor se lleva a cabo a través de un caudalímetro tipo coriolis, *C*. El reactor autoclave *R* posee una camisa de refrigeración conectada a un baño térmico de recirculación para regular su temperatura de trabajo. Además, *R* está conectado a través de la válvula *V4*, a un elemento filtrante, *F*, de metal sinterizado sobre el cual se coloca una membrana filtrante, presurizado a la presión de trabajo,  $P_w$ , cuya función es la de retener el precipitado indeseado que se pudiera formar por acción antisolvente del CO<sub>2</sub> durante la etapa de presurización. El elemento filtrante *F*, está conectado a su vez a una unión tipo T de mezclado, *T-mezcla*, donde se lleva a cabo el mezclado en condiciones turbulentas entre la disolución despresurizada y la fase acuosa contenida en *DI*, la cual se bombea a flujo constante mediante la bomba *P2*. El sistema disperso obtenido se recoge después de la unión tipo T en el colector *RC*. Como elementos de control del proceso, tenemos un indicador de presión en el reactor *R*, que nos proporciona el valor de la presión de trabajo,  $P_w$  y dos indicadores de temperatura, un termopar en el interior del reactor *R* y otro después de la válvula de despresurización *V5*, que miden continuamente las temperaturas de trabajo  $T_w$  y la temperatura final de la despresurización,  $T_F$ .



**Figura 2.9.** Esquema del equipamiento empleado en los experimentos DELOS-SUSP. P: bomba; C: caudalímetro másico; S: intercambiadores de calor; V: válvula; F: filtro; R: reactor a alta presión; T: T de mezclado; IT: indicador de temperatura; IP: indicador de presión; D1: depósito disolución acuosa; RC: colector de la dispersión.

El protocolo de operaciones que se diseñó para llevar a cabo el procedimiento DELOS-SUSP, empleando la configuración experimental esquematizada en la Figura 2.9, es el que se describe a continuación:

1. Un determinado volumen de disolución o dispersión del soluto de interés en un disolvente orgánico convencional, con una sobresaturación inicial  $\beta_i$ , a la temperatura  $T_w$ , se carga dentro del reactor de alta presión  $R$ .
2. Presurización del reactor hasta la presión de trabajo  $P_w$ , mediante la adición de CO<sub>2</sub>. Inicialmente se abren las válvulas  $V2$  y  $V3$  para presurizar el reactor hasta la presión de línea de CO<sub>2</sub>, y después se activa la bomba  $P1$  para continuar la presurización del sistema hasta alcanzar la  $P_w$ . Para aumentar la velocidad de mezclado entre el CO<sub>2</sub> y

la disolución o dispersión inicial, durante esta etapa se mantiene activada la agitación mecánica.

3. Dejar el sistema en agitación a las condiciones de trabajo durante 30-60 minutos, para conseguir su completa homogeneización y que se alcance el equilibrio térmico.
4. Despresurización del sistema a través de la válvula *V5* desde la presión  $P_w$  hasta la presión atmosférica. Inicialmente se abre la válvula *V4* que comunica el reactor *R* con el filtro *F2* presurizado a la  $P_w$ . A continuación, se desconecta el sistema de agitación. Después se abren las válvulas *V1* y *V3*, que permiten la entrada de una corriente de nitrógeno en la parte superior del reactor *R*, para mantener la presión del interior del reactor constante durante la despresurización y empujar verticalmente el contenido del reactor durante la despresurización cuando se abre la válvula *V5*. La válvula *V5* es del tipo “back-pressure”, que nos permite regular la presión durante la despresurización una vez alcanzada la presión de trabajo desada  $P_w$ . La bomba *P2* se ceba con disolución acuosa del tensoactivo *D1*. Simultáneamente a la apertura de la válvula de despresurización *V5*, se pone en marcha la bomba *P2*, para poder llevar a cabo la despresurización de la disolución expandida del reactor *R* sobre la corriente acuosa de tensoactivo impulsada por la bomba *P2* en la T de mezclado *T*. El sistema disperso final formado se recoge en el colector *RC*.

Los derechos de utilización y explotación del proceso DELOS-SUSP están debidamente protegidos tanto en España como en Europa.<sup>(23)</sup>

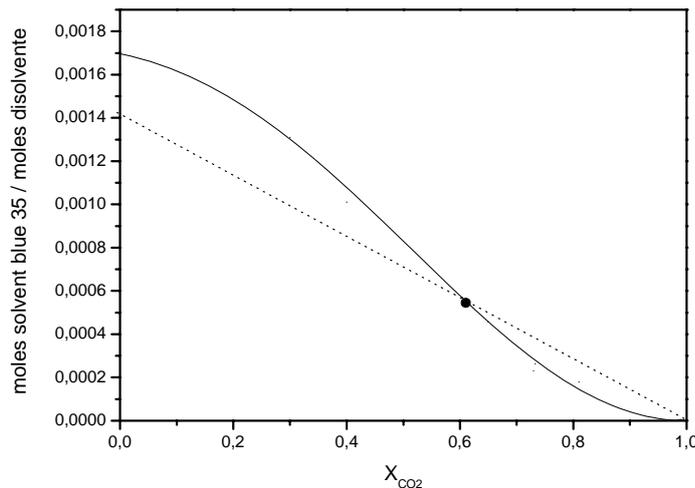
### 2.3 Aplicación del proceso DELOS-SUSP

La aplicabilidad del proceso DELOS-SUSP para la obtención de suspensiones de otros materiales moleculares también ha sido explorada a lo largo de este trabajo. Así, se estudió la viabilidad de emplear el proceso DELOS-SUSP para la preparación de dispersiones del colorante 1,4-bis-(n-butilamino)-9,10-antraquinona, conocido como “solvent blue 35”, y del ácido ( $\pm$ )-2-(4-isobutilfenil propiónico), denominado como ibuprofeno, partiendo de disoluciones expandidas con  $\text{CO}_2$  de ambos compuestos. Ambos sistemas cumplen los requisitos necesarios para poder ser procesados mediante el método DELOS-SUSP (ver Apartado 2.2.2). En efecto, son insolubles en agua y

solubles en alguna mezcla “disolvente orgánico/CO<sub>2</sub>” a unas condiciones de presión y de temperatura de trabajo determinadas.

### 2.3.1 Preparación de suspensiones del colorante “solvent blue 35” mediante DELOS-SUSP

La 1,4-bis-(n-butilamino)-9,10-antraquinona es un colorante insoluble en agua, muy utilizado para preparación de tintas y barnices. La preparación de una suspensión de “solvent blue 35” en agua se llevó a cabo empleando el sistema “solvent blue 35/acetona/agua/CO<sub>2</sub>”. Este sistema se caracteriza por el hecho de que el carácter cosolvente del CO<sub>2</sub> se manifiesta en un amplio rango de valores de la fracción molar de CO<sub>2</sub>, hasta un valor de  $X_{CO_2}=0,63$  para una sobresaturación inicial  $\beta_i=0,8$ , convirtiéndolo en un sistema muy adecuado para procesarlo por DELOS-SUSP (ver Figura 2.10).



**Figura 2.10.** Curva de solubilidad del colorante “solvent blue 35” en el sistema “acetona/CO<sub>2</sub>” a  $P_w=10\text{MPa}$  y  $T_w=298\text{K}$  medidos con un analizador de fases a alta presión a partir del método punto evanescente (■); Ajuste realizado para visualizar la evolución de la solubilidad (□□). Variación de la solubilidad según un proceso de dilución ideal (---).

Así pues, en base al comportamiento de solubilidad del “solvent blue 35” en mezclas “acetona/CO<sub>2</sub>”, y mediante la configuración experimental y los procedimientos de operación descritos en el Apartado 2.2, se llevó a cabo el experimento NSSB8 por DELOS-SUSP. En dicho experimento, se añadió CO<sub>2</sub> sobre un volumen de 160mL de una disolución de “solvent blue 35” en acetona con una  $\beta_i=0,8$ , para preparar una disolución expandida a  $P_w=10\text{MPa}$  y  $T_w=308\text{K}$ . Esta disolución se despresurizó sobre

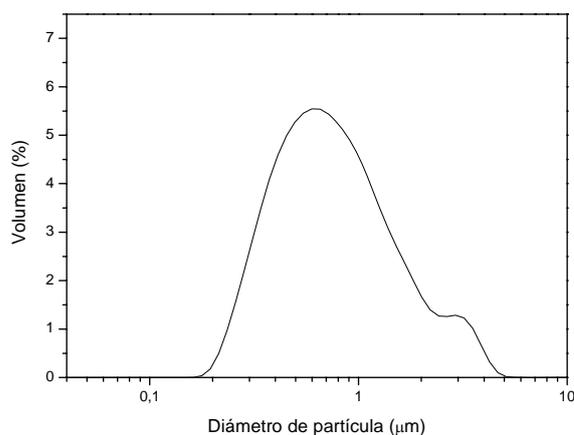
1500mL de agua. En la Tabla 2.2 están descritos los parámetros de operación, rendimientos de precipitación y características estructurales de la suspensión obtenida.

**Tabla 2.2.** Experimento DELOS-SUSP para la preparación de una suspensión formada por el sistema “solvent blue 35/acetona/agua”

| Experimento | $\beta_i$ | $X_{CO_2}$ | $\Delta T^a$<br>(°C) | Rendimiento <sup>b</sup><br>(%) | GAS <sup>c</sup><br>(%) | Tamaño                      |                   |         | Estabilidad |
|-------------|-----------|------------|----------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------|---------|-------------|
|             |           |            |                      |                                 |                         | D(0,5) <sup>d</sup><br>(nm) | I.U. <sup>e</sup> | Estable |             |
| NSSB8       | 0,8       | 0,81       | -82                  | 73                              | 25                      | 760                         | 11,1              | Si      |             |

[a] Descenso de temperatura medido durante la despresurización. [b] Rendimiento del proceso en %. [c] Precipitación por efecto anti-solvente del CO<sub>2</sub>. [d] Diámetro medio de partícula en volumen. [e] Índice de uniformidad de la muestra (%). [f] Condiciones de operación: P<sub>w</sub>=10MPa, T<sub>w</sub>=308K.

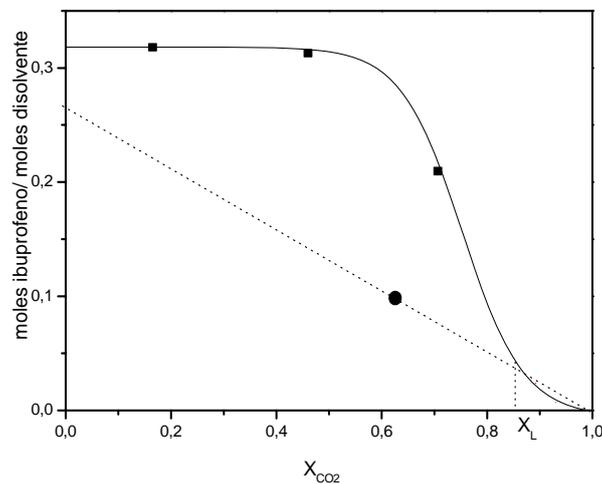
El análisis del sistema mediante diferentes técnicas de caracterización, mostró que éste estaba formado por una suspensión estable de partículas de “solvent blue 35” con una distribución de tamaños de partícula centrada por debajo de 1µm (ver Figura 2.11). La cantidad de sólido precipitado por el efecto antisolvente del CO<sub>2</sub> (rendimiento GAS) tiene un valor considerable como consecuencia de que la fracción molar de CO<sub>2</sub> está ligeramente por encima del valor límite a partir del cual el CO<sub>2</sub> actúa como antisolvente. De todas formas, estos resultados preliminares fueron considerados muy positivos, ya que se comprobó que se pueden obtener suspensiones de este colorante con distribuciones de tamaños de partícula estrechas y estables en el tiempo.



**Figura 2.11.** Imagen de SEM de una suspensión de “solvent blue 35” en agua obtenida mediante el proceso DELOS-SUSP.

### 2.3.2 Preparación de suspensiones de “ibuprofeno” mediante DELOS-SUSP

El ibuprofeno es un fármaco insoluble en agua y muy soluble en disolventes orgánicos, con solubilidades generalmente superiores a 0,3 g/mL a temperatura ambiente. Los experimentos de preparación de suspensiones acuosas de este fármaco con el método DELOS-SUSP se realizaron con el sistema “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>”. Como puede observarse en la Figura 2.12, este sistema se caracteriza por el hecho de que el efecto cosolvente del CO<sub>2</sub> se manifiesta en un amplio rango de valores de fracción molar de CO<sub>2</sub>, hasta un valor de  $X_{CO_2}=0,83$  para una sobresaturación inicial  $\beta_i=1$ , convirtiéndolo en un sistema muy adecuado para procesarlo por DELOS-SUSP.<sup>(24)</sup>



**Figura 2.12.** Valores de solubilidad del ibuprofeno en el sistema “acetona/CO<sub>2</sub>” a  $P_w=10\text{MPa}$  y  $T_w=298\text{K}$  medidos con un analizador de fases a alta presión a partir del método del punto evanescente (■). Ajuste realizado para visualizar la evolución de la solubilidad (□□). Variación de la solubilidad según un proceso de dilución ideal (---).

Así pues, en base al comportamiento de solubilidad del ibuprofeno en mezclas “acetona/CO<sub>2</sub>”, y mediante la configuración experimental y los procedimientos de operación descritos en el Apartado 2.2, se llevó a cabo el experimento NSIBU31 por DELOS-SUSP. En este experimento, se añadió CO<sub>2</sub> sobre 160mL de una disolución de ibuprofeno en acetona ( $\beta_i=1$ ) para preparar una disolución expandida a  $P_w=10\text{MPa}$ ,  $T_w=308\text{K}$  y  $X_{CO_2}=0,64$ . Dicha disolución se despresurizó sobre 1500mL de agua. Los parámetros de operación, rendimientos de precipitación y características de la suspensión obtenida se describen en la Tabla 2.3.

**Tabla 2.3.** Experimento DELOS-SUSP para la preparación de una suspensión formada por el sistema “ibuprofeno/acetona/agua”

| Experimento | $\beta_i$ | $X_{CO_2}$ | $\Delta T^a$<br>(°C) | Rendimiento <sup>b</sup><br>(%) | GAS <sup>c</sup><br>(%) | Tamaño                                   |                   |         | Estabilidad |
|-------------|-----------|------------|----------------------|---------------------------------|-------------------------|--|-------------------|---------|-------------|
|             |           |            |                      |                                 |                         | D(0,5) <sup>d</sup><br>( $\mu\text{m}$ ) | I.U. <sup>e</sup> | Estable |             |
| NSIBU31     | 0,84      | 0,64       | -84                  | 96                              | 3                       | 6,3                                      | 46,4              | No      |             |

[a] Descenso de temperatura medido durante la despresurización. [b] Rendimiento del proceso en %. [c] Precipitación por efecto antisolvente del CO<sub>2</sub>. [d] Diámetro medio de partícula en volumen. [e] Índice de uniformidad de la muestra (%). [f] Condiciones de operación: P<sub>w</sub>=10MPa, T<sub>w</sub>=308K, [Tween80]=1% en volumen.

La caracterización del sistema disperso por diferentes técnicas mostró que éste estaba formado por una suspensión de partículas de ibuprofeno con un diámetro medio de partícula de 6,3  $\mu\text{m}$ . El rendimiento DELOS-SUSP fue muy elevado en este caso, no dándose prácticamente ninguna precipitación por efecto antisolvente del CO<sub>2</sub>.

## 2.4 Utilización de tensoactivos en el proceso DELOS-SUSP

Los tensoactivos son compuestos anfífilicos, que tienen una cabeza constituida por un grupo funcional hidrofílico, y una cola hidrofóbica formada generalmente por una cadena hidrocarbonada. Las propiedades fisicoquímicas de un tensoactivo dependen del grado de ramificación y de la longitud de la cadena hidrocarbonada y de la posición del grupo polar en la molécula.<sup>(25)</sup> El tamaño relativo de los grupos hidrofóbicos y polares es decisivo para determinar su comportamiento en un medio acuoso. Por otra parte, los tensoactivos se clasifican, en función de la naturaleza de la cabeza polar, en neutros, catiónicos, aniónicos, y zwitterionicos. Un tensoactivo zwitterionico es aquel que posee tanto carga positiva como negativa en condiciones normales. Por otro lado, un tensoactivo anfotérico, es aquel que dependiendo del pH puede ser catiónico, aniónico o zwitterionico. La propiedad de los tensoactivos de modificar la tensión superficial de los compuestos hace que sean utilizados en múltiples aplicaciones. Por ejemplo, se usan como agentes emulsionantes o dispersantes en la preparación de cosméticos, fármacos, alimentos, etc.

En los procesos de cristalización, los tensoactivos interfieren en el crecimiento cristalino, facilitando la obtención de cristales de tamaños más pequeños o inhibiendo el crecimiento de una determinada cara del cristal ó bien pueden disminuir los fenómenos

de aglomeración o de agregación de las partículas formadas.<sup>(26)</sup> Por ello se creyó conveniente estudiar en este trabajo, la influencia de la presencia de tensoactivos de diversa naturaleza (neutro o iónico- catiónico y aniónico) en el proceso DELOS-SUSP para la obtención de sistemas dispersos. En concreto, se estudió la influencia del uso de mezclas de tensoactivos de distinta naturaleza, y el momento de adición del tensoactivo en el proceso DELOS-SUSP, sobre las características estructurales de sistemas dispersos de colesterol obtenidos mediante esta nueva metodología. Para realizar estos experimentos se utilizó la configuración experimental y los procedimientos de operación descritos en el Apartado 2.2.

#### **2.4.1 Influencia de la naturaleza del tensoactivo**

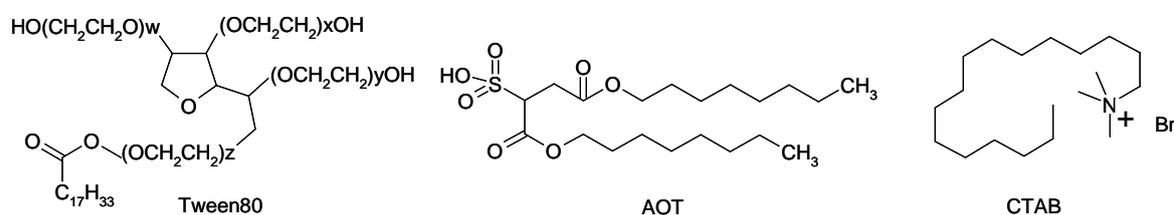
En este apartado, se describe el estudio de la influencia de varios tipos de tensoactivos sobre las características estructurales y la estabilidad del sistema disperso “colesterol/acetona/tensoactivo/agua” obtenido por DELOS-SUSP. Para ello se seleccionaron tres tensoactivos de naturaleza catiónica, aniónica y neutra, como moléculas representativas de esas familias.

El tensoactivo de naturaleza neutra seleccionado fue el monoleato de sorbitol (20) y polioxietileno, conocido comercialmente como Tween80, de la familia de los polisorbatos (ésteres de ácidos grasos del sorbitol). La cabeza de grupo polar es un poliéter constituido por unidades de oxietileno. Es soluble en agua y en acetona. Este tipo de tensoactivos son solubles en agua y acetona, y además normalmente suelen ser compatibles con los otros tipos de tensoactivos. Por otra parte, no son sensibles a la dureza del agua y sus propiedades físico químicas son altamente dependientes de la temperatura del medio. Este tensoactivo se utiliza normalmente como agente emulsionante y dispersante en fármacos y productos alimentarios.

El tensoactivo aniónico elegido fue el bis(2-etilhexil)sulfosucinato de sodio, conocido comercialmente como AOT, cuyo grupo polar es un grupo sulfonato, que lo hace ser soluble en acetona, metanol y agua. Los tensoactivos aniónicos no suelen ser compatibles con los catiónicos, siendo además bastante sensibles a la dureza del agua, y sus propiedades físico-químicas se ven muy afectadas por los electrolitos presentes en el medio. Este tensoactivo ha sido muy utilizado para formar micelas inversas en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria.

El bromuro de cetiltrimetilamonio, conocido comercialmente como CTAB, fue el elegido como modelo de tensoactivo catiónico. En este tensoactivo la carga catiónica reside sobre un átomo de nitrógeno cuaternario y debido a ello este tensoactivo no es sensible al pH del medio. Asimismo, el CTAB es capaz de adherirse fuertemente a la mayoría de las superficies, lo que lo convierte en un compuesto muy útil para la modificación de superficies “in situ”. Sin embargo, el principal inconveniente de los tensoactivos catiónicos es que forman complejos insolubles con los tensoactivos aniónicos que acaban destruyendo la dispersión.

En la Figura 2.13 están representadas las estructuras químicas de los tres tensoactivos de distinta naturaleza empleados en este estudio.



**Figura 2.13.** Representación de las estructuras químicas de los tensoactivos: Tween80, AOT y CTAB.

En esta serie de experimentos, disoluciones de colesterol en acetona expandidas con CO<sub>2</sub> de igual X<sub>CO2</sub> y β<sub>i</sub>, fueron despresurizadas sobre disoluciones acuosas de tensoactivos de diferente naturaleza: neutro, catiónico y aniónico. En todos los experimentos el volumen de disolución inicial de colesterol en acetona fue de 160mL y el de fase acuosa de 1500mL con un 1% (en volumen) de tensoactivo.

**Tabla 2.4.** Influencia de la naturaleza del tensoactivo sobre las características estructurales del sistema disperso “colesterol/tensoactivo/acetona/agua” obtenido por DELOS-SUSP

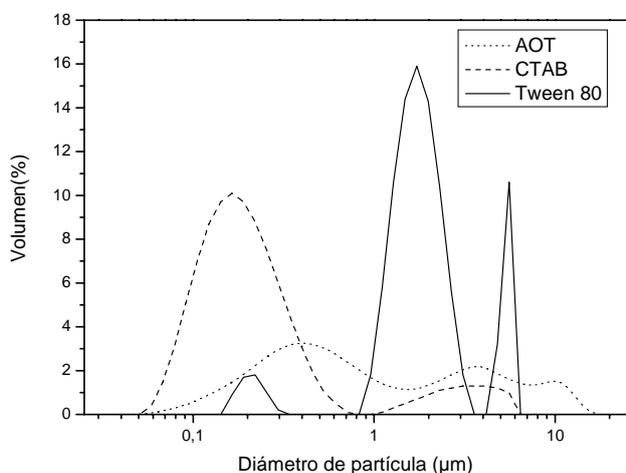
| Experimento | Tensoactivo |      | ΔT <sup>a</sup><br>(°C) | Rendimiento <sup>b</sup><br>(%) | Tamaño                      |                   | Estabilidad            |         |
|-------------|-------------|------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------|------------------------|---------|
|             | Naturaleza  | T80  |                         |                                 | D(0,5) <sup>c</sup><br>(nm) | I.U. <sup>d</sup> | ζ <sup>e</sup><br>(mV) | Estable |
| NS99        | Neutro      | T80  | -61                     | 91                              | 3370                        | 26,6              | +11,3                  | No      |
| NS16        | Aniónico    | AOT  | -65                     | 87                              | 2410                        | 2,7               | +23,2                  | No      |
| NS98        | Catiónico   | CTAB | -55                     | 92                              | 170                         | 5,3               | +87,4                  | Si      |

[a] Descenso de temperatura medido durante la despresurización. [b] Rendimiento del proceso en %. [c] Diámetro medio de partícula en volumen. [d] Índice de uniformidad de la muestra (%). [e] Potencial zeta. [f] Condiciones de operación: P<sub>w</sub>=10MPa, T<sub>w</sub>=308K, β<sub>i</sub>=0,8, X<sub>CO2</sub>=0,6.

En la Tabla 2.4 están descritos los parámetros de operación empleados, los rendimientos, las distribuciones de tamaño de partícula y el potencial zeta de las dispersiones obtenidas en los experimentos DELOS-SUSP realizados con el sistema “colesterol/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” con los distintos tensoactivos (Tween80, AOT y CTAB).

De los tres sistemas dispersos de colesterol obtenidos por DELOS-SUSP en presencia de tensoactivos de distinta naturaleza, se observó que la dispersión obtenida con CTAB como tensoactivo, es el sistema disperso que presentaba la distribución de tamaños de partícula más pequeña (170nm) y el más estable (+87,4mV). En cambio, las dispersiones obtenidas con los tensoactivos aniónico (AOT) y neutro (Tween80), muestran distribuciones de tamaño de partícula relativamente grandes, superiores a 2µm, y valores de potencial zeta bajos, inferiores +30mV (ver Tabla 2.4). Estos resultados indican que los tensoactivos, AOT y Tween80, no son adecuados para estabilizar las moléculas de colesterol en estas condiciones, ya que con ellos las partículas de colesterol tienen una mayor tendencia a formar aglomerados y agregados.

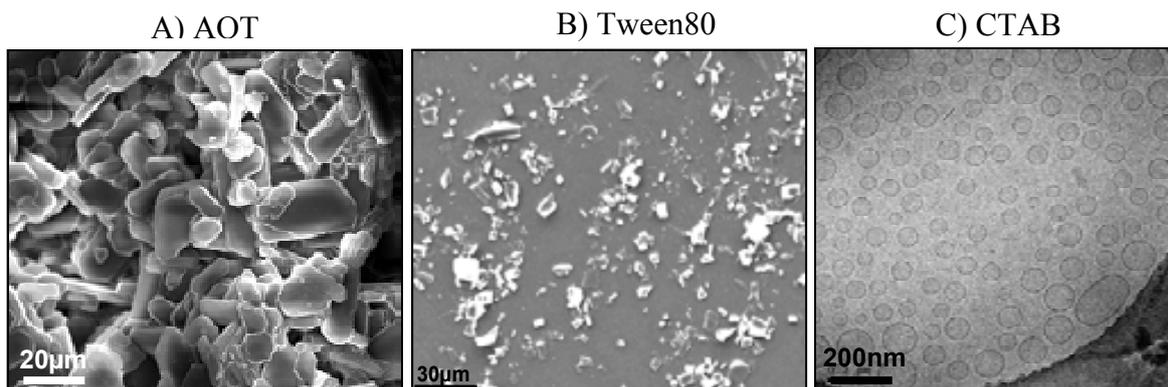
En la Figura 2.14 están representadas las curvas de distribución de tamaño de partícula de los sistemas dispersos obtenidos con los tres tipos de tensoactivos, medidas mediante la técnica de dispersión de luz dinámica.



**Figura 2.14.** Curvas de distribución de tamaños de partícula medidas por DLS de los sistemas “colesterol/acetona/agua/tensoactivo” obtenidos en los experimentos NSCOL16, NSCOL98 y NSCOL99.

La organización supramolecular de los sistemas dispersos formados por colesterol y los tres tensoactivos de diferente naturaleza, obtenidos mediante el proceso DELOS-SUSP, se estudió mediante microscopía de transmisión electrónica en condiciones criogénicas (crio-TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM) siguiendo los procedimientos descritos en la Parte Experimental. Las imágenes de crio-TEM y SEM (Figura 2.15) revelan que los sistemas dispersos formados por “colesterol/AOT/acetona/agua” y “colesterol/Tween80/acetona/agua” están formados

por una suspensión de cristales de colesterol que tienden a sedimentar con en el tiempo. En cambio el sistema disperso formado por colesterol/CTAB/acetona/agua presenta objetos con una forma esférica de tipo vesícula unilamelar (small unilamellar vesicles, SUV), muy homogénea en forma y tamaño. Las vesículas que se obtuvieron presentaron un rango de tamaños de partícula comprendidos entre 50-200nm, que está en concordancia con la distribución de tamaños de partícula medida por dispersión de luz dinámica.



**Figura 2.15.** Imágenes de SEM de los sistemas dispersos “colesterol/acetona/agua” obtenidos por DELOS-SUSP en presencia de los tensoactivos: AOT (A) y Tween80 (B). Imágenes de crio-TEM del sistema disperso “colesterol/acetona/agua” obtenidos por DELOS-SUSP en presencia de CTAB (C).

Por tanto, se puede concluir que la presencia del tensoactivo CTAB, en el proceso DELOS-SUSP, influye de forma crucial sobre la organización supramolecular de las partículas de colesterol en el medio acuoso, así como sobre el tamaño de partícula y la estabilidad del sistema. En efecto, a diferencia de lo que ocurre con el Tween80 y el AOT que dan lugar a cristales, el CTAB da lugar a vesículas unilamelares de tamaño nanoscópico muy homogéneas.

#### 2.4.2 Influencia de mezclas de tensoactivo de distinta naturaleza

La adsorción de un tensoactivo es un proceso de transferencia de las moléculas de tensoactivo desde el medio dispersante hacia la superficie de la fase dispersa, donde las moléculas de tensoactivo tienden a reorientarse en función de su balance hidrofílico-hidrofóbico. Otro fenómeno a tener en cuenta es que las cinéticas de adsorción dependen de la naturaleza del adsorbente y del tipo de tensoactivo empleado. Así, es

bien conocido que mediante la utilización de mezclas binarias de tensoactivos se puede modificar las cinéticas de adsorción de los tensoactivos en la interfase “dispersa/dispersante”, ya que en algunos casos se produce un sinergismo que favorece la adsorción de las moléculas de uno de los tensoactivos sobre dicha fase dispersa, como consecuencia, por ejemplo de la formación de pares iónicos o de interacciones entre las cadenas hidrocarbonadas de tensoactivos catiónicos-aniónicos.<sup>(27)</sup>

Por todo lo anterior, se creyó oportuno estudiar en este trabajo la influencia de una mezcla de dos tensoactivos compatibles de distinta naturaleza, como uno catiónico y otro neutro, sobre las características estructurales del sistema disperso modelo “colesterol/acetona/agua” obtenido mediante el proceso DELOS-SUSP. Los tensoactivos escogidos para este estudio fueron el CTAB y el Tween 80. En esta serie de experimentos, se emplearon disoluciones de colesterol en mezclas “acetona/CO<sub>2</sub>” a alta presión, con una misma sobresaturación inicial  $\beta_i$ , que fueron despresurizadas sobre disoluciones acuosas de CTAB y Tween 80 que contenían diferentes relaciones molares de ambos tensoactivos. En todos los experimentos el volumen de disolución inicial de colesterol en acetona fue de 160mL y el de la fase acuosa de 1500 mL con un 1% (en volumen) de tensoactivo en total. En la Tabla 2.5 están recogidos los parámetros de operación empleados, los rendimientos, las distribuciones de tamaño de partícula y el valor del potencial zeta de cada uno de estos experimentos. Así, se realizaron cinco experimentos distintos empleando los tensoactivos Tween80 y CTAB con relaciones molares de Tween80/CTAB de 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 y 0/100.

**Tabla 2.5.** Influencia de mezclas de tensoactivos de distinta naturaleza sobre las características estructurales del sistema disperso “colesterol/tensoactivo/acetona/agua”, obtenido por DELOS-SUSP.

| Experimento | Tensoactivo                            | Rendimiento <sup>b</sup><br>(%) | Tamaño                      |                   | Estabilidad                  |         |
|-------------|--|---------------------------------|-----------------------------|-------------------|------------------------------|---------|
|             | Tween80/CTAB <sup>a</sup><br>(mol/mol) |                                 | D(0,5) <sup>c</sup><br>(nm) | I.U. <sup>d</sup> | $\zeta$ <sup>e</sup><br>(mV) | Estable |
| NS85        | 100/0                                  | 91                              | 630                         | 3,4               | +11,3                        | No      |
| NS89        | 75/25                                  | 88                              | 540                         | 12,8              | +49,6                        | Si      |
| NS87        | 50/50                                  | 89                              | 508                         | 17,2              | +55,1                        | Si      |
| NS88        | 25/75                                  | 90                              | 170                         | 10,4              | +65,9                        | Si      |
| NS80        | 0/100                                  | 92                              | 130                         | 3,4               | +92,3                        | Si      |

[a] Relación molar T80/CTAB. [b] Rendimiento del proceso en %. [c] Diámetro medio de partícula en volumen. [d] Índice de uniformidad de la muestra (%). [e] Potencial zeta. [f] Condiciones de operación:  $P_w=10\text{MPa}$ ,  $T_w=308\text{K}$ ,  $\beta_i=0,8$ ,  $X_{\text{CO}_2}=0,6$ ,  $[\text{Tensoactivo}]_{\text{total}}=1\%$  en volumen.

En base a los resultados descritos en la Tabla 2.5, se observó que conforme se incrementa la proporción del tensoactivo catiónico en la mezcla, manteniendo constante la concentración total de tensoactivo empleado a un 1%, el sistema disperso muestra una distribución de tamaños de partícula más pequeña y estrecha, pudiendo pasar de un diámetro medio de partícula de 630 nm en el experimento NS85 (100% de Tween80) a un diámetro de 130nm en el experimento NS80 (100% de CTAB).

La organización supramolecular de las diferentes dispersiones obtenidas también fue estudiada por crio-TEM. Las imágenes de crio-TEM revelaron que el sistema formado empleando una relación de Tween80/CTAB=100/0 estaba formado por una suspensión de cristales de colesterol. Sin embargo, cuando se incrementa la proporción del CTAB en la mezcla de tensoactivos, el sistema pasa a estar formado por dos poblaciones de partículas, una decreciente de cristales de colesterol y otra creciente de vesículas unilamelares, como consecuencia de la reorganización que experimentan las moléculas del colesterol en presencia del CTAB. Asimismo, se observa que cuando la relación de Tween80/CTAB es del 0/100, el sistema está formado únicamente por vesículas. En cuanto a la distribución de potencial zeta, se observa que éste se hace más positivo conforme se incrementa la cantidad de tensoactivo catiónico, es decir, conforme aumenta la fuerza iónica del medio, favoreciéndose así la estabilización del sistema. La estabilidad de esas dispersiones también fue analizada en un analizador óptico según el procedimiento descrito en la Parte Experimental. Así, estudiando los perfiles de dispersión (backscattering) de luz obtenidos de esos sistemas (Tabla 2.5), se constató que en las dispersiones obtenidas con relaciones molares de Tween80/CTAB=100/0 (Figura 2.16), y 75/25 (Figura 2.17), los fenómenos de inestabilidad predominantes son atribuidos al crecimiento de las partículas, y al de sedimentación de éstas. El crecimiento de las partículas queda reflejado por una variación de los perfiles de dispersión a lo largo de toda la altura de la muestra durante el periodo de medida. Mientras que el fenómeno de sedimentación, se visualiza por un aumento acusado de la dispersión de luz en la parte más baja de la muestra ( $h < 5\text{mm}$ ).

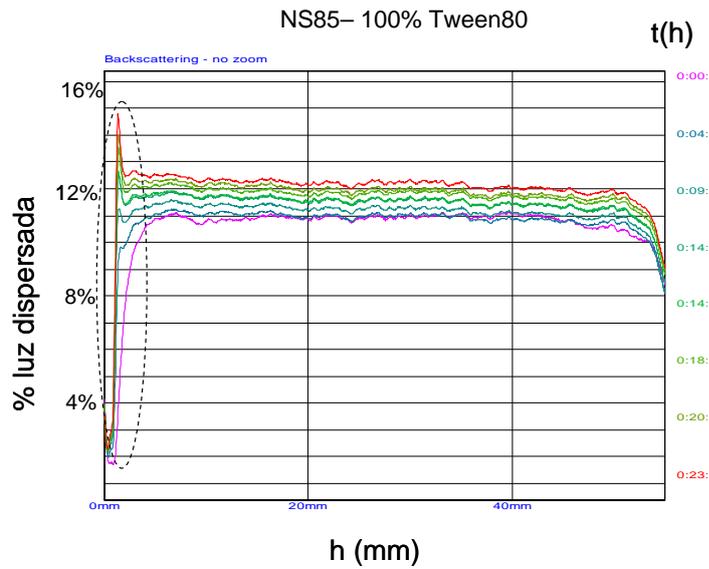


Figura 2.16. Variación con el tiempo del % de luz dispersada a distintas alturas (h) del vial que contiene el sistema disperso obtenido en el experimento NS85.

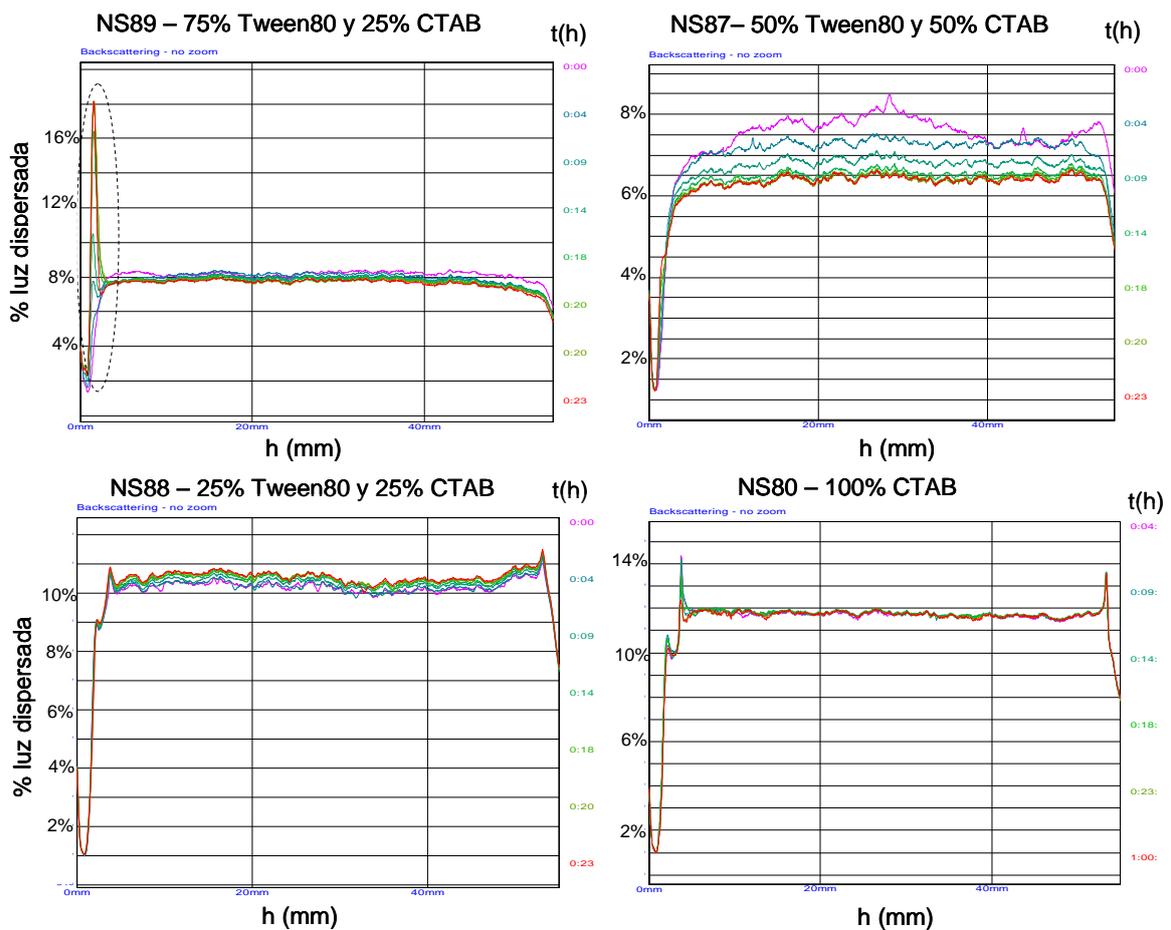


Figura 2.17. Variación con el tiempo del % de luz dispersada a distintas alturas (h) del vial que contiene los sistemas dispersos obtenidos en los experimentos NS89, NS87, NS88 y NS80.

En las dispersiones obtenidas con fracciones molares de Tween80/CTAB=50/50 y 25/75 (Figura 2.17), el fenómeno de inestabilidad predominante es la variación del tamaño de partícula, ya que los perfiles de dispersión varían ligeramente con el tiempo. En estos casos el fenómeno de sedimentación es casi inexistente, dato que está en acuerdo con el aumento de la estabilidad de estas muestras respecto a las anteriores, tal y como se desprende de los valores del potencial zeta (ver Tabla 2.5). El sistema disperso obtenido con una relación molar de Tween80/CTAB=0/100, resultó ser la dispersión más estable de todas, tal y como se puede ver en sus perfiles de dispersión. Éstos se mantienen constantes a lo largo de todo el tiempo del barrido, quedando prácticamente todos solapados entre sí (ver Figura 2.17).

Como conclusión, se puede decir que las mezclas de tensoactivos Tween80 y CTAB, empleadas para la preparación de sistemas dispersos “colesterol/acetona/agua” por DELOS-SUSP, no permiten modificar de forma continua la organización supramolecular del sistema, dando lugar a mezclas de cristales y vesículas en el medio acuoso, según sea la naturaleza y concentraciones de cada uno de los tensoactivos utilizados.

### **2.4.3 Influencia del procedimiento de adición del tensoactivo**

En todos los experimentos descritos anteriormente, el tensoactivo se disolvió en la fase acuosa inicial, para luego mezclarse con la disolución despresurizada. Con la idea, de mejorar y estabilizar en sus estadios más iniciales las partículas formadas durante la despresurización de la disolución expandida en el proceso DELOS-SUSP. También se realizaron varios experimentos en los que el tensoactivo en lugar de encontrarse disuelto en la fase acuosa, se disolvió en la disolución orgánica inicial.

Así, tal y como se muestra en la Tabla 2.6, se realizaron una serie de experimentos utilizando el sistema “colesterol/tensoactivo/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” como modelo, para determinar la influencia del procedimiento de adición del tensoactivo sobre las características estructurales de los sistemas dispersos obtenidos. Se estudiaron tres casos. El primero en el que el tensoactivo solo está presente en la fase acuosa. En el segundo caso, el tensoactivo solo está presente en la fase orgánica a expandir con CO<sub>2</sub>, y en un tercer caso en el que el tensoactivo es añadido a ambas disoluciones, es decir,

tanto a la disolución orgánica como a la fase acuosa. Para ello, se emplearon dos tensoactivos de diferente naturaleza, uno catiónico, CTAB y uno no-iónico, Tween80.

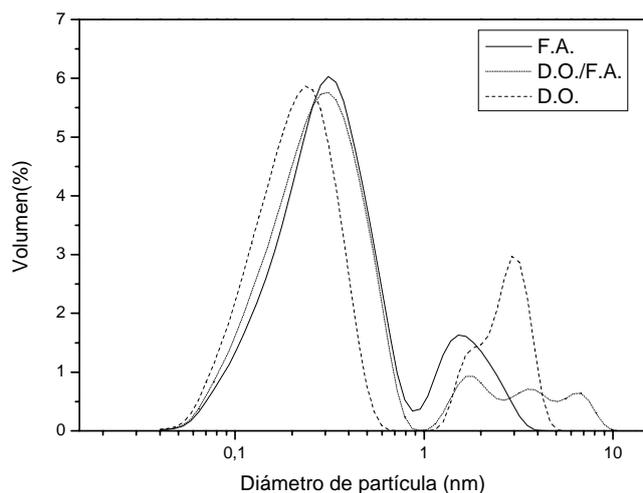
En estos experimentos, se utilizaron disoluciones de colesterol en acetona ( $V_i=160\text{mL}$ ) con una misma sobresaturación inicial  $\beta_i=0,8$ , con o sin tensoactivo, que fueron expandidas con  $\text{CO}_2$  hasta alcanzar una  $X_{\text{CO}_2}=0,6$ , y que fueron posteriormente despresurizadas en continuo sobre un volumen de 1500 mL de fase acuosa con o sin tensoactivo. En la Tabla 2.6 están recogidos los parámetros de operación empleados, los rendimientos, y las características estructurales de las dispersiones obtenidos en los diferentes experimentos. En el experimento NS1 el tensoactivo fue adicionado únicamente a la fase orgánica, mientras que en los experimentos NS5, NS80 y NS14 lo fue a la fase acuosa y en los experimentos NS7 y NS18 se hizo tanto a la disolución orgánica como a la fase acuosa.

**Tabla 2.6.** Influencia del procedimiento de la adición del tensoactivo sobre las características estructurales del sistema disperso “colesterol/tensoactivo/acetona/agua”, obtenido por DELOS-SUSP.

| Experimento | Tensoactivo            | Adición         | $\Delta T^a$ | Rendimiento <sup>b</sup> | Tamaño |                     | Estabilidad       |           |
|-------------|------------------------|-----------------|--------------|--------------------------|--------|---------------------|-------------------|-----------|
|             |                        |                 | (°C)         |                          | (%)    | D(0,5) <sup>c</sup> | I.U. <sup>d</sup> | $\zeta^e$ |
|             |                        |                 |              |                          | (nm)   |                     | (mV)              |           |
| NS1         | Tween80 <sup>h</sup>   | DO <sup>f</sup> | -56          | 84                       | 1170   | 4,1                 | -                 | No        |
| NS5         | Tween80 <sup>i</sup>   | FA <sup>g</sup> | -55          | 85                       | 350    | 15,1                | +25,8             | Si        |
| NS7         | Tween80 <sup>h,i</sup> | DO/FA           | -57          | 90                       | 310    | 47,7                | +6,25             | No        |
| NS80        | CTAB <sup>j</sup>      | FA              | -55          | 92                       | 130    | 3,4                 | +92,3             | Si        |
| NS14        | CTAB <sup>j</sup>      | FA              | -41          | 77                       | 220    | 45,7                | +77,19            | Si        |
| NS18        | CTAB <sup>j,k</sup>    | DO/FA           | -52          | 55                       | 110    | 41,3                | +74,23            | Si        |

[a] Descenso de temperatura medido durante la despresurización. [b] Rendimiento del proceso en %. [c] Diámetro medio de partícula en volumen. [d] Índice de uniformidad de la muestra (%). [e] Potencial zeta. [f] DO, disolvente orgánico. [g] FA, fase acuosa. [h] [Tween80]<sub>DO</sub>=1% en volumen. [i] [Tween80]<sub>FA</sub>=1% en volumen. [j] [CTAB]<sub>FA</sub>=1% en volumen. [k] [CTAB]<sub>DO</sub>=1% en volumen. [l] Condiciones de operación:  $P_w=10\text{MPa}$ ,  $T_w=308\text{K}$ ,  $\beta_i=0,8$ ,  $X_{\text{CO}_2}=0,6$

Si comparamos las suspensiones preparadas con el tensoactivo Tween80, se observa que las curvas de distribución de tamaños de partículas correspondientes a los sistemas preparados adicionando el tensoactivo únicamente en la fase acuosa (NS5) y en las fases orgánica/acuosa (NS7) son muy similares, y a la vez muy distintas a la observada cuando el tensoactivo se adiciona solo en la fase orgánica (NS1) (ver Figura 2.18).

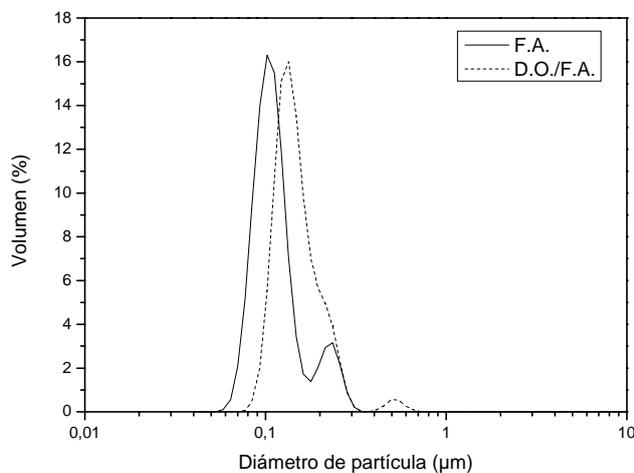


**Figura 2.18.** Curvas de distribución de tamaños de partícula medidas por DLS de los sistemas “colesterol/Tween80/acetona/agua” obtenidos en los experimentos NS1 (DO), NS5 (FA) y NS7 (DO/FA) (DO:disolvente orgánico, FA:fase acuosa).

Respecto a la estabilidad del sistema, las suspensiones obtenidas son muy inestables, tal y como muestran los bajos valores del potencial zeta obtenidos (inferiores a +30mV). De acuerdo a ello, estos sistemas presentaran una gran tendencia a sedimentar, pudiéndose inferir por lo tanto que el Tween80 no es capaz de estabilizar al colesterol a estas condiciones. Otra de las conclusiones es que la adición del tensoactivo en la disolución orgánica además de en la fase acuosa, no causa una disminución significativa ni del crecimiento de las partículas ni de los fenómenos de agregación. Esta ausencia de mejora en las características estructurales del sistema disperso obtenido, cuando se adiciona tensoactivo en la disolución orgánica inicial, probablemente sea debida a la insolubilidad que presenta el Tween80 en las mezclas “colesterol/acetona/CO<sub>2</sub>”. Esta insolubilidad provocaría que el Tween80 sería incapaz de controlar el crecimiento cristalino, y la aglomeración de las partículas que estarían gobernados probablemente, por una acción de recubrimiento de éste sobre la superficie de las partículas formadas durante la cristalización. Esta acción superficial afectaría a las velocidades de nucleación y frenaría el crecimiento de las partículas e impediría a su vez, gracias a su efecto estabilizante en las interfaces durante la cristalización, que las partículas más pequeñas tiendan a juntarse por coalescencia.

Por otro lado, si comparamos los sistemas dispersos obtenidos con el tensoactivo catiónico CTAB, podemos observar que en el experimento NS18, en el cual el tensoactivo se adicionó tanto en la disolución acuosa como en la disolución orgánica expandida, tiene un diámetro medio de partícula inferior y una distribución de tamaños más homogénea, que las obtenidas en el caso en el que el tensoactivo solo estaba en la

fase acuosa, experimento NS14 (ver Figura 2.19). Respecto a las estabildades, los sistemas dispersos obtenidos en ambos experimentos son muy estables, con valores de potencial zeta muy parecidos, superiores a +70mV. Teniendo en cuenta la insolubilidad del CTAB en mezclas “colesterol/acetona/CO<sub>2</sub>” a las condiciones de trabajo, se puede decir que esta mejora en la propiedades del sistema disperso no es debida a la presencia del CTAB en la disolución orgánica inicial, sino debido al aumento de la concentración total de CTAB en el medio disperso, y a su mayor capacidad de estabilizar las partículas de colesterol, ya que tiene una mayor facilidad para reducir la tensión interfacial de las partículas de colesterol, y formar vesículas termodinámicamente estables.



**Figura 2.19.** Curvas de distribución de tamaños de partícula medidas por DLS de los sistemas “colesterol/CTAB/acetona/agua” obtenidos en los experimentos NS14 (F.A.), y NS18 (D.O./F.A.). (D.O.:disolvente orgánico, F.A.:fase acuosa)

El estudio del comportamiento de solubilidad de los dos tensoactivos utilizados, se realizó también en este trabajo. Concretamente se estudió la solubilidad del CTAB y el Tween80 en mezclas “acetona/CO<sub>2</sub>”, “colesterol/acetona/CO<sub>2</sub>” a 10MPa y 308K y en agua destilada a presión y temperatura atmosféricas, mediante el método del punto evanescente empleando un analizador de fases a alta presión. El método de punto evanescente y la descripción del analizador de fases se encuentran descritos en la parte Experimental. La Tabla 2.7 muestra los resultados de este estudio. Así, el tensoactivo CTAB es totalmente insoluble en mezclas “acetona/CO<sub>2</sub>” y “colesterol/acetona/CO<sub>2</sub>”, mientras que el Tween80 es totalmente soluble en mezclas “acetona/CO<sub>2</sub>” e insoluble en mezclas “colesterol/acetona/CO<sub>2</sub>” a una fracción molar  $X_{CO_2}=0,6$ .

**Tabla 2.7.** Solubilidades del CTAB y Tween80 en mezclas “acetona/CO<sub>2</sub>”, “colesterol/acetona/CO<sub>2</sub>” y H<sub>2</sub>O

|         | “Acetona/CO <sub>2</sub> ” <sup>a</sup> | “Colesterol/acetona/CO <sub>2</sub> ” <sup>b</sup> | H <sub>2</sub> O <sup>c</sup> |
|---------|---|--|-------------------------------|
| CTAB    | Insoluble <sup>d</sup>                  | Insoluble <sup>d</sup>                             | Soluble <sup>d</sup>          |
| Tween80 | Soluble <sup>e</sup>                    | Insoluble <sup>d</sup>                             | Ilimitada                     |

[a] P<sub>w</sub>=10MPa, T<sub>w</sub>=308K, X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=0,6. [b] P<sub>w</sub>=10MPa, T<sub>w</sub>=308K, X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=0,6, β<sub>l</sub>=0,9. [c] P<sub>w</sub>=0,1MPa, T<sub>w</sub>=308K. [d] [CTAB]= 2% en peso. [e] [Tween80]= 4% en peso.

Para poder completar este apartado, habría que determinar la influencia de la adición de un tensoactivo de naturaleza aniónica, tal como el AOT, en la disolución orgánica, y la influencia de la adición de un tensoactivo que sea soluble en mezclas “colesterol/acetona/CO<sub>2</sub>”, sobre las características fisico-químicas del sistema disperso de colesterol obtenido mediante el proceso DELOS-SUSP. Sin embargo, dada la poca eficacia del tensoactivo AOT en la formación de dispersiones de colesterol con el proceso DELOS-SUSP, no se creyó oportuno determinar su solubilidad.

## 2.5 Conclusiones

- ☒ Se ha desarrollado un nuevo método de preparación de suspensiones en fases acuosas con FCs, basado en una modificación del proceso de precipitación DELOS, que se ha denominado DELOS-SUSP.
- ☒ Se han preparado suspensiones de colesterol en fases acuosas con tamaños de partícula microscópicos y con una elevada homogeneidad en su morfología y tamaño.
- ☒ Se ha demostrado que en el método DELOS-SUSP, el procedimiento de mezclado entre la disolución despresurizada del soluto a dispersar y la fase acuosa, determina las características estructurales de la fase dispersa de la suspensión.
- ☒ Se ha demostrado que mediante el proceso DELOS-SUSP se pueden obtener, también, suspensiones del colorante “solvent blue 35” y de ibuprofeno en agua, estables en el tiempo, y con una distribución de tamaños de partícula con una media por debajo de la micra.
- ☒ La adición del tensoactivo catiónico CTAB al sistema “colesterol/acetona/agua” ha permitido la obtención de sistemas vesiculares

monocapa de colesterol y CTAB en agua, muy homogéneos, estables en el tiempo, y con una distribución de tamaños con una media comprendida entre 50-200nm.

## 2.6 Referencias

- (1) (a) Ventosa, N.; Sala, S.; Torres, J.; Llibre, J.; Veciana, J., *Cryst. Growth Des.* **2001**, *1*, 299; (b) Ventosa, N.; Veciana, J.; Rovira, C.; Sala, S., (Carbueros Metálicos S.E), Patente WO0216003, ES2170008, EP1314465, US2003098517, CA2426449, AU8406501 **2000**; (c) Sala, S., *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona **2005**; (d) Muntó, M. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona **2005**.
- (2) Mehnert, W.; Mäder, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 165.
- (3) Rabinow, B.E., *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 785.
- (4) Müller, R.H.; Becker, R.; Kruss, B.; Peters K. Patent USA nº 5858410 **1998**
- (5) Louey, M.D.; Van Oort, M.; Hichey, A.J., *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1200.
- (6) Rasenack, N.; Müller, B.W. *Pharm. Dev. Technol.* **2004**, *9*, 1, 1.
- (7) (a) Sarkari, M.; Brown, J.; Chen, X.; Swinnea, S.; Williams, R.O.; Johnston, K.P., *Int. J. Pharm.* **2002**, *243*, 17. (b) Parrot, E.L. Comminution. In *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Decker Inc., New York, **1990**, *3*, 101. (c) Shalaev, E.; Shalaeva, M.; Zografu, G. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 584. (d) Waltersson, J.-O.; Lundgren, P. *Acta Pharm. Sue.* **1985**, *22*, 291.
- (8) (a) Horn, D.; Rieger, J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4330. (b) Horn, D., *Angew. Makromol. Chem* **1989**, *166/167*, 139.
- (9) (a) Sala, S., *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona **2005**; (b) Muntó, M. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona **2005**. (c) Mullin, J.W. *Crystallization*, Butterworth Heineman, Oxford **2000**.
- (10)(a) Cansell, F.; Aymonier, C.; Loppinet-Serani, A., *Curr. Opin, Solid State Mat. Sci.* **2003**, *7*, 331. (B) Holmes, J.D., Lyons, D.M.; Ziegler, K.J., *Chem, Eur. J.* **2003**, *9*, 2199; (c) Woods, H.M.; Silva, M.M.C.G.; Nouvel, C.; Shakesheff, K.M.; Howdle, S.M., *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 1663; (d) Eckert, C.A.; Knurson, B.L.; Debenedetti, P.B., *Nature* **1996**, *383*, 313.
- (11) Jessop, P.G.; Leitner, W. *Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids*, Wiley-VCH, **1999**.
- (12)(a) Jung, J.; Perrut, M. *J. Supercrit. Fluids* **2001**, *20*, 179. (b) Hakuta, Y.; Hayashi, H.; Arai, K. *Curr. Opin. Solid State Mat. Sci.* **2003**, *7*, 341.

- (13)(a) Pathak, P.; Meziani, M.J.; Desai, T.; Sun, Y-P., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10842; (b) Sun, Y-P.; Meziani, M.J.; Pathak, P.; Qu, L. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1366).
- (14)(a) Perrut, M.; Clavier, J-Y., *Ing. Eng. Chem. Res.* **2003**, *42*, 6375; (b) Charoenchaitrakool, M.; Dehghani, F.; Foster, N.R., *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, *39*, 4794
- (15)Meziani, M.J.; Pathak, P.; Hurereanu, R.; Thies, M.C.; Inc., R.M.; Sun, Y-P, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 704.
- (16)Meziani, M.J.; Sun, Y.-P., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8015.
- (17)Meziani, M.J.; Pathak, P.; Beacham, F.; Allard, L.F.; Sun, Y-P., *J. Supercrit. Fluids* **2005**, *34*, 91.
- (18) (a) Dixon, D.J.; Johnston, K.P., *J.Appl, Polym. Sci.* **1993**, *50*, 1929; (b) Mawson, S.; Yates, M.Z.; Oneill, M.L.; Johnston, K.P., *Langmuir* **1997**, *13*, 1519; (c) Mawson, S.; Johnston, K.P.; Betts, D.E.; McClain, J.B.; Desimone, J.M., *Macromolecules* **1997**, *30*, 71.
- (19)Martin, T.M.; Bandi, N.; Shulz, R.; Roberts, C.B.; Kompella, U.B., *AAPS PharmSciTech* **2002**, *3*, 3.
- (20)Ventosa, N.; Sala, S.; Veciana, J. *J. Supercrit. Fluids* **2003**, *26*, 33;
- (21)(a)Tan, C.P.; Nakajima, M., *Food Chemistry* **2005**, *92*, 661; (b) Türk, M.; Lietzow, R., *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 402.
- (22)(a) Wubbots, F.E., *Ph.D. Thesis*, University of Delft (Netherlands) **2000**; (b) Wubbots, F.E.; Bruinsma, O.S.L.; van Rosmalen, G.M., *J. Supercrit. Fluids* **2004**, *32*,79.
- (23)Ventosa, N.; Veciana, J.; Sala, S.; Cano, M. Patentes ES2265262 y WO2006/0799889.
- (24)Muntó, M., *Trabajo de Investigación*, Universidad Autónoma de Barcelona **2005**.
- (25)Binks, B.P., *Modern characterization methods of surfactant systems*, Marcel Dekker **1999**, Surfactants science series, 83, Capítulo 3.
- (26)Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg,B.; Lindman, B.; *Surfactants an polymers in aqueous solution*, Wiley-VCH, England **2003**, *83*, Capítulo 1..
- (27)Paria, S.; Khilar, K.C., *Advance in Colloid and Interface Sciences* **2004**, *110*, 75.



## Capítulo 3

# Estudio del proceso DELOS-SUSP para obtener vesículas unilamelares

Históricamente, el interés por las vesículas monocapa de tamaño nanométrico, más conocidas como vesículas unilamelares (“small unilamellar vesicles”, SUVs) ha estado motivado por su biocompatibilidad y similitud a determinadas estructuras biológicas, como las membranas celulares.<sup>(1),(2)</sup> La investigación y el desarrollo de las SUVs está en pleno auge, ya que se ha comprobado experimentalmente que tienen la capacidad de actuar como materiales inteligentes sensibles a estímulos externos –cambios de temperatura o pH-, además de ser capaces de mimetizar sistemas naturales específicos, como las células, teniendo además un amplio rango de aplicaciones que van desde su utilización como plantillas nanoscópicas para la preparación de materiales nanoestructurados hasta su empleo como vehículos para el suministro controlado de fármacos, genes y enzimas en medicina, y de suplementos nutracéuticos en alimentación y en cosmética.<sup>(3)</sup>

Como se describió en el capítulo anterior, la utilización del tensoactivo catiónico CTAB durante el procesado del colesterol mediante el proceso DELOS-SUSP, condujo a la obtención de estructuras vesiculares, en lugar de partículas sólidas suspendidas en una fase acuosa. Dado el gran potencial tecnológico de este tipo de estructuras, por ejemplo en nanomedicina, en la presente Tesis Doctoral se han realizado diferentes estudios para tener una mayor comprensión de su estructura supramolecular y profundizar en el mecanismo de su formación. En este capítulo, también se describe la labor realizada para extender la utilización de esta nueva metodología para la obtención de otros sistemas vesiculares.

### 3.1 Introducción

En un compuesto anfílico se pueden distinguir en su estructura molecular dos partes claramente diferenciadas, una parte hidrofóbica (cola apolar) y otra hidrofílica (cabeza polar). En disolución acuosa y a bajas concentraciones, los compuestos

anfífilicos a menudo se comportan como modificadores de las interfases, acumulándose preferiblemente en la interfase agua/aire. Por otra parte, esos compuestos tienen como propiedad más destacada la de disminuir la tensión superficial de las disoluciones acuosas y de aquí que también se les conozca como tensoactivos.

Los compuestos anfífilicos se pueden clasificar en tres categorías en función de su solubilidad en el medio acuoso.<sup>(4)</sup> Los compuestos de la clase I son insolubles en agua, como el colesterol, los de la clase II son insolubles en agua, liotrópicos y son capaces de formar en su seno cristales líquidos, como por ejemplo los fosfolípidos. Por último, los compuestos anfífilicos de la clase III son solubles en agua y son capaces de formar micelas. Los compuestos anfífilicos pertenecientes a la clase II, se suelen auto-reorganizar en una fase acuosa, dando lugar a diferentes organizaciones supramoleculares de tipo cristal líquido, con estructura cúbica, hexagonal o lamelar, dependiendo de su geometría e interacciones moleculares. Una de las características más interesantes de las organizaciones supramoleculares resultantes es que su topología está compartimentada, lo cual simula, en cierta manera, a los sistemas biológicos.<sup>(5)</sup> Una de las organizaciones supramoleculares más frecuente que dan lugar los compuestos de clase II es la de tipo vesicular.

Los anfífilicos pertenecientes a la clase III pueden existir como moléculas asociadas o disociadas, dependiendo de su concentración. En disoluciones acuosas diluidas, éstos se encuentran presentes en forma disociada o de monómero. Por encima de una cierta concentración, llamada concentración micelar crítica (*cmc*), para una temperatura determinada, estos compuestos se organizan en agregados a través de la asociación de sus partes lipófilas dando lugar a las micelas. Las disoluciones acuosas micelares pueden actuar como medio solubilizante de sustancias insolubles o muy poco solubles en agua, mediante su incorporación en su compartimento interior. Además, los compuestos anfífilicos de clase III, solubles en agua, son capaces de formar monocapas inestables en las interfases aire-, aceite-, sólido-agua, debido al constante y rápido intercambio de monómeros que se da con el medio.

### **3.1.1. Sistemas vesiculares**

Un sistema vesicular está formado por estructuras moleculares esféricas cerradas, constituidas por una membrana anfífilica que aísla su interior del medio externo. Si la membrana está formada por sólo una bicapa de moléculas anfífilicas, la

vesícula se denomina “unilamelar”, y vesícula “multilamelar”, si tiene varias capas. Las vesículas se clasifican dependiendo de su tamaño y del número de bicapas en vesículas multilamelares grandes (“large multilamellar vesicles”, MLV), vesículas unilamelares grandes (“large unilamellar vesicles”, LUV), vesículas unilamelares pequeñas (“small unilamellar vesicles”, SUV), y en vesículas multivesiculares (“multivesicular vesicles”, MVV). Su tamaño puede variar desde los 20nm hasta unos pocos micrómetros, dependiendo de muchos factores. Las vesículas también se pueden clasificar en función de la naturaleza de sus constituyentes en liposomas (formadas por fosfolípidos), niosomas (constituidas por tensaoactivos no iónicos), y vesículas catiónicas (formadas por mezclas de tensoactivos catiónicos y aniónicos).<sup>(6)</sup>

La micro-estructura y el número de bicapas que forman la membrana de las vesículas, son dos factores muy determinantes de la estabilidad, funcionalidad y la respuesta a estímulos externos de la vesícula, así como su permeabilidad a través de membranas biológicas.<sup>(2)</sup> Por ejemplo, la utilización de vesículas en el campo farmacéutico para el transporte de activos terapéuticos, vendrá determinada por tres requisitos básicos, el primero es que la vesícula sea intrínsecamente estable desde el punto de vista físico-químico. El segundo, está relacionado con la impermeabilidad de la membrana y su resistencia a la penetración de sustancias, bien sean las propias moléculas encapsuladas intencionadamente, ó las que se encuentren en el medio externo.<sup>(7)</sup> El último requisito es la biocompatibilidad de los constituyentes de la vesícula.

En la actualidad, para llevar a cabo la preparación de un sistema vesicular con éxito se deben tener en cuenta toda una serie de parámetros claves para su formulación. Se deberá estudiar la naturaleza de sus constituyentes, bien sean de naturaleza sintética ó natural, y la estabilidad de los mismos en disolución frente a procesos de degradación. Asimismo, se deberá estudiar la temperatura de transición de las fases que puedan producirse en las vesículas; por ejemplo la transición con la temperatura de una fase de tipo gel ordenada a una fase de tipo cristal líquido desordenada. La carga de la membrana, también será un parámetro muy interesante a tener en cuenta, ya que ésta podrá influir en las funciones desempeñadas por la propia vesícula. Por último, se debe tener en cuenta la mezcla de compuestos anfífilicos adecuada para que el sistema vesicular resultante, posea las propiedades físicas, químicas y biológicas idóneas para una determinada aplicación.

Hoy en día, los liposomas son los sistemas vesiculares más conocidos y desarrollados, cuyo estudio y aplicación constituye ya en sí mismo todo un campo de investigación. Los liposomas fueron descubiertos por A.D. Bangham en el año 1965.<sup>(8)</sup> Éstos están formados principalmente por fosfolípidos, anfifílico de clase II. Los liposomas poseen una estabilidad en disolución limitada, de ahí que en la mayoría de sus formulaciones se suele adicionar colesterol, cuya función será la de estabilizar y dar rigidez a la membrana, afectando así a su comportamiento fisiológico.<sup>(9)</sup> Experimentalmente se ha comprobado que el colesterol es capaz de cambiar el grado de orden en la membrana, afectando a la permeabilidad de ésta frente iones, a su compresibilidad y a la difusión del oxígeno a su través.<sup>(10)</sup> Las principales desventajas de los liposomas son su elevado precio, y la inestabilidad química que presentan sus ingredientes, ya que son fácilmente oxidables. Por tanto, las preparaciones de liposomas requerirán de una elevada pureza de los lípidos constituyentes, y unas condiciones especiales de almacenamiento y manejo.<sup>(11)</sup> Actualmente se está haciendo un gran hincapié en el desarrollo de nuevos compuestos anfifílicos sintéticos que puedan formar vesículas y que sean capaces de resolver los problemas relacionados con su inestabilidad química y/o bioquímica, además de poder conseguir ajustar la estructura de las vesículas en función de la aplicación deseada.<sup>(12)</sup> En este contexto, los niosomas, formados por tensoactivos no-iónicos están siendo ensayados como alternativa a los clásicos liposomas.<sup>(13)</sup> Los niosomas están formados principalmente por un tensoactivo no-iónico (anfifílico de clase III), el cual puede formar vesículas mediante la adición de colesterol (anfifílico de clase I), y pequeñas cantidades de tensoactivos aniónicos.<sup>(14)</sup> Los niosomas presentan varias desventajas, como por ejemplo la necesidad de que las vesículas tengan que estar recubiertas por una capa externa de polietilenglicol (PEG), cuya función será la de estabilizar las vesículas y reducir la tendencia de éstas a aglomerarse e incrementar su tamaño.<sup>(15)</sup> Por otro lado, se ha comprobado experimentalmente que los niosomas requieren de la presencia de colesterol para ser estables.<sup>(16)</sup> De forma similar a los liposomas, los niosomas presentan diversos problemas prácticos como son los fenómenos de desestabilización, producidos por la agregación y fusión, y una gran permeabilidad de su membrana lo que limita la protección de los fármacos encapsulados y su vida media.<sup>(17)</sup>

Otra posible alternativa a los liposomas, son las *vesículas catiónicas* y las *catiónicas*, formadas las primeras por tensoactivos catiónicos, como por ejemplo el DDAB, el DODAB y el DOTAP,<sup>(18)</sup> y las segundas por una mezcla de tensoactivos

catiónicos y aniónicos. Este tipo de vesículas son rápidas y fáciles de formular, sus ingredientes son fácilmente disponibles comercialmente y además son químicamente estables contra procesos oxidativos de degradación.<sup>(19)</sup> Este tipo de vesículas tienen además la capacidad de formar complejos de manera espontánea con ácidos nucleicos como el ADN o el ARN. Recientemente, se ha comprobado que estas estructuras son muy prometedoras como vehículos para la liberación de genes en terapias genéticas y como sustitutos de los vectores virales en aplicaciones clínicas.<sup>(20)</sup>

### **3.1.2 Preparación de sistemas vesiculares por metodologías convencionales**

Las principales limitaciones que frenan la aplicación de los sistemas vesiculares en biomedicina, son la baja estabilidad de las preparaciones, el elevado coste de su producción a gran escala, la toxicidad de la formulación por la presencia de residuos orgánicos y la baja eficiencia de encapsulación de fármacos que se consigue en la mayoría de los casos. Así pues, existe un gran interés, por ejemplo en las compañías farmacéuticas, en el desarrollo de nuevas metodologías que permitan superar esas limitaciones.

Existen actualmente numerosos métodos de preparación de vesículas. El método *Bangham* es uno de los más utilizados para la preparación de vesículas. Este método consiste en la disolución del anfifílico en un disolvente orgánico, seguido de la eliminación del disolvente orgánico, vía evaporación, para formar una película del lípido en las paredes del recipiente. Las vesículas se forman, mediante agitación, al hidratar la película seca de lípido con una fase acuosa. Las vesículas obtenidas presentan tamaños de varias micras y bajos rendimientos de encapsulación, cuando se emplea una disolución acuosa del fármaco en el proceso de hidratación. Éste método es uno de los métodos más simples para la formación de vesículas, sin embargo su uso está limitado al laboratorio y no puede emplearse a escala industrial, debido a la dificultad de eliminar el disolvente orgánico, a los problemas de homogeneización de la muestra y a su pequeña escala de producción.<sup>(21),(22),(23),(24)</sup>

El método de eliminación de detergente ("*Detergent Depletion*") es un proceso alternativo que opera en condiciones suaves y permite la producción de vesículas muy homogéneas en tamaño y morfología. Este método se basa en la formación de micelas constituidas por un lípido y un tensoactivo, seguido de la eliminación del detergente

mediante dilución del sistema en agua hasta formar las vesículas. Los principales inconvenientes de esta metodología que impiden su escalado industrial son la baja concentración final de vesículas en el medio, la baja eficiencia en la encapsulación de compuestos hidrofóbicos, la larga duración del proceso, y los residuos de detergente en el medio.<sup>(21),(25),(26)</sup>

Otro método muy utilizado para la preparación de vesículas es el de *inyección*. Este método se basa en la disolución del lípido en un disolvente orgánico (etanol ó éter) y su posterior inyección sobre una fase acuosa, que actúa como antisolvente precipitando las vesículas. Los principales inconvenientes de esta metodología son la elevada cantidad residual de disolvente orgánico en el medio, ya que este es inyectado directamente sobre la fase acuosa, lo que implica la necesidad de procesos post-formación para su eliminación (ultrafiltración), y las bajas velocidades de inyección cuando se utiliza éter como fase orgánica.<sup>(27),(28),(29)</sup>

El proceso de evaporación de fase inversa ("*Reverse-phase evaporation*", REV) desarrollado por Szoka et al. también ha sido utilizado con éxito para la preparación de vesículas. Este método se basa en la formación de micelas inversas, es decir, de gotitas de agua rodeadas por un lípido dispersas en una fase orgánica. Mediante la eliminación progresiva del disolvente orgánico por evaporación se forma un gel viscoso, hasta que llega un punto en el cual gel se colapsa y se forma una suspensión de vesículas. El principal inconveniente de esta metodología es que el material encapsulado se encuentra en contacto con el disolvente orgánico, por lo que, este proceso no es válido para moléculas frágiles, tales como los péptidos.<sup>(30)</sup>

En este campo también se han empleado métodos basados en emulsiones para la preparación de vesículas. Estos métodos se basan en la formación de una emulsión agua-en-aceite ("*water-in-oil*", w/o), mediante la adición de una pequeña cantidad de agua sobre un gran volumen de una fase orgánica inmiscible en la cual se encuentra disuelto el lípido. La mezcla se agita para dispersar la fase acuosa como pequeñas gotitas a través de la fase orgánica. Después dicha emulsión w/o es añadida sobre un gran volumen de fase acuosa se agita, dando lugar a la formación de una doble emulsión w/o/w. Esta doble emulsión se transforma en un sistema vesicular, al eliminar el disolvente orgánico mediante una corriente de nitrógeno. Con este método, se obtiene en la mayoría de los casos vesículas multilamelares con tamaños comprendidos entre 1-2  $\mu\text{m}$ .<sup>(21),(31),(32)</sup>

Los métodos desarrollados más recientemente para la preparación de vesículas son el proceso de liofilización de disoluciones monofase (*“Freeze Drying of Monophase Solutions”*), mediante el cual se pueden obtener vesículas liofilizadas. Este proceso se basa en la disolución del lípido en un alcohol y en agua con sacarosa para formar una disolución isotrópica monofásica, y su posterior liofilización.<sup>(33)</sup> Jahn et al. han desarrollado el método *“Microfluidic Channel”*, en el cual se emplean canales rectangulares de microfluídica para la síntesis controlada de vesículas. En este método, la disolución del lípido se inyecta en el canal central de una red microfluídica, mientras que la fase acuosa se hace pasar por los canales paralelos al anterior, que confluyen con el canal central en un punto determinado. Se ha demostrado que jugando con las velocidades de flujo de las corrientes se pueden obtener sistemas vesiculares monodispersos.<sup>(34)</sup>

Con la mayoría de las metodologías descritas anteriormente se obtienen vesículas con distribuciones de tamaños de partícula poco homogéneas, y con morfologías tipo multilamelar. De ahí, que generalmente después de la formación de las vesículas, sean necesarias otras etapas de proceso para modificar su tamaño, lamelaridad, y homogeneidad. Las metodologías de post-formación más comunes son la sonicación, la extrusión y la homogeneización a alta presión.<sup>(21),(25)</sup>

En resumen, los procesos convencionales de preparación de sistemas vesiculares permiten la formación de vesículas con tamaños comprendidos entre 20nm y varios micrómetros. Los métodos convencionales no son muy adecuados para procesar moléculas frágiles, debido a su exposición a disolventes orgánicos volátiles, tensoactivos, procesos con ultrasonidos y homogeneización. Otras desventajas de los métodos convencionales son los elevados tiempos de procesado, la complejidad del proceso, las dificultades en el escalado y la dificultad de conseguir altas eficiencias de encapsulación. Los residuos de disolvente orgánico sobre el producto es otro de los problemas, debido al coste de su eliminación y manipulación.<sup>(35)</sup>

Así pues hoy en día existe un gran interés en el desarrollo de nuevos métodos para la preparación de vesículas, en los que las limitaciones inherentes a las técnicas de producción por metodologías convencionales sean reducidas o eliminadas.

### 3.1.3 Preparación de sistemas vesiculares con fluidos comprimidos

Ya se ha comentado antes el gran potencial que tienen los sistemas vesiculares dentro la industria farmacéutica, sin embargo su utilización industrial depende en gran medida del desarrollo de métodos de preparación baratos, simples y de una sola etapa de procesado, y que además cumplan con los protocolos de “*Good Manufacturing Practice*” (GMP).<sup>(35)</sup> Una de las estrategias que se está explorando es la utilización de FCs para la preparación directa de SUVs. El fluido comprimido más utilizado es el CO<sub>2</sub>, ya que como se ha mencionado anteriormente, no es inflamable, ni tóxico, ni corrosivo, es barato, permite operar en condiciones estériles y puede ser fácilmente eliminado después del procesado mediante despresurización.<sup>(36),(37)</sup>

Las primeras técnicas desarrolladas para la preparación de vesículas con CO<sub>2</sub>, fueron los métodos de inyección con fluidos supercríticos (“*Supercritical Fluid Injection*”) y de descompresión con fluidos supercríticos (“*Decompression*”) desarrollados por Castor y Chu en 1994.<sup>(38)</sup> En el método de inyección, se inyecta en condiciones supercríticas una mezcla formada por el lípido, un FC, y un disolvente orgánico, que actúa como co-solvente a través de una boquilla sobre una disolución acuosa. Alternativamente, el método de descompresión se basa en la descompresión de una mezcla formada por un lípido, un FC, un disolvente orgánico co-solvente y una disolución acuosa a través de una boquilla directamente sobre el aire. Mediante esas metodologías se han podido preparar vesículas estériles, aptas para uso farmacéutico, con distribuciones de tamaño de partícula estrechas, y con un contenido muy bajo en disolvente orgánico.<sup>(39)</sup>

En el año 2005, Castor desarrolló un nuevo proceso denominado “*SuperFluids phospholipid nanosome*” (SFS-CFN), basado en la combinación de las metodologías de inyección y descompresión.<sup>(40)</sup> La clave del proceso consiste en la capacidad del FC para disolver el lípido, mediante la ayuda de cosolventes, y una corriente efectiva de recirculación, que asegure la completa disolución del lípido antes de efectuar la despresurización del sistema. Los principales inconvenientes de esta metodología son las elevadas temperaturas (>50°C) y presiones de trabajo (>30MPa), requeridas para la disolución completa del soluto.

El método de “*Supercritical Fluid Liposome*”, desarrollado por Frederiksen et al., es muy similar al método de inyección antes descrito. Este proceso se basa en la disolución de un lípido y colesterol en CO<sub>2</sub> supercrítico, utilizando etanol como

cosolvente. El lípido y el colesterol, previamente colocados en un recipiente tipo cartucho, son disueltos mediante el paso de una corriente de recirculación de etanol/CO<sub>2</sub>, para su posterior despresurización sobre una fase acuosa. Esta metodología se ha comprobado que es fácilmente escalable, y los consumos de disolvente orgánico son bastante reducidos, aunque presenta rendimientos muy bajos de encapsulación.<sup>(41)</sup>

Otake et al. han desarrollado el método de evaporación en fase reversa supercrítica (“*Supercritical Reverse Phase Evaporation*”, scRPE). En este método, el lípido, el disolvente orgánico, y el FCs se mezclan en una celda de volumen variable. Posteriormente se introduce lentamente en ella una disolución acuosa y se reduce la presión del sistema mediante la liberación del gas comprimido, formándose así las vesículas. Las vesículas obtenidas en este proceso presentan morfologías mayoritariamente de tipo elipsoidal con amplias distribuciones de tamaño.<sup>(37)</sup> Otake et al. también han desarrollado recientemente una nueva versión mejorada del proceso scRPE libre del disolvente orgánico, denominada “*Improved Supercritical Reverse Phase Evaporation*” (ISCRPE). En este método, la mezcla no homogénea formada por el lípido y la fase acuosa se prepara bajo agitación, después se presuriza con CO<sub>2</sub> hasta formar una emulsión CO<sub>2</sub>/agua, la cual finalmente se despresuriza para formar las vesículas.<sup>(42)</sup>

Otra posibilidad para la formación de sistemas vesiculares, es la formación previa de nanopartículas sólidas del lípido con FCs y su posterior dispersión en una fase acuosa. Así por ejemplo, se han conseguido micronizar nanopartículas de lecitina de soja mediante los procesos SAS (*Supercritical antisolvent*)<sup>(43)</sup>, RESS (*Rapid expansion of supercritical solutions*)<sup>(44)</sup>, y ASES (Aerosol Solvent Extraction System).<sup>(45)</sup> Los principales inconvenientes de los procesos antes mencionados, que micronizan el lípido como etapa inicial, son los elevados tamaños de partícula que presentan las vesículas obtenidas después de la rehidratación y el elevado número etapas de procesado requeridas para alcanzar el sistema vesicular final. Sin embargo, ciertos autores sugieren que la producción de nanopartículas del lípido en lugar de vesículas puede ser beneficiosa, ya que la estabilidad del sistema vesicular durante su almacenamiento es un problema, y las nanopartículas de lípido pueden ser fácilmente rehidratables a vesículas antes de su uso.<sup>(45)</sup>

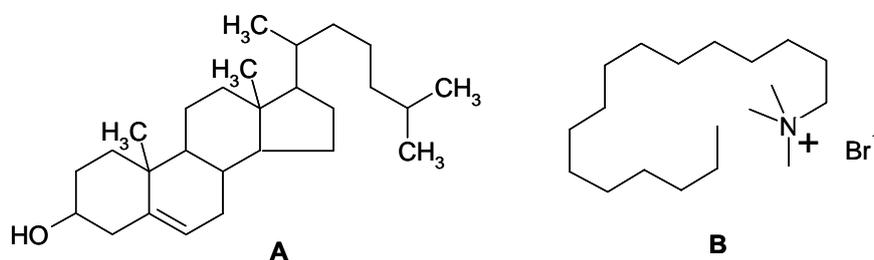
Las metodologías descritas anteriormente de preparación de vesículas con CO<sub>2</sub> supercrítico permiten la producción de SUVs estériles, con una calidad igual o superior a la obtenida por muchos de los métodos convencionales, mediante procesos de una o

dos etapas de producción y sin elevados consumos de disolventes orgánicos. A pesar de estas claras ventajas, la producción de vesículas con FCs, a día de hoy, presenta algunas limitaciones, entre ellas cabe mencionar las elevadas presiones ( $>20\text{MPa}$ ) y temperaturas ( $>50^\circ\text{C}$ ) requeridas, debido a la baja solubilidad de los lípidos en el  $\text{CO}_2$  supercrítico.<sup>(46)</sup>

Tal y como se describió en el Capítulo anterior (ver Apartado 2.3), el procesado del colesterol mediante la tecnología DELOS-SUSP en presencia del tensoactivo catiónico CTAB, condujo a la formación de un sistema vesicular en lugar de a una suspensión. Este resultado sugirió la posibilidad de utilizar esta tecnología simple, robusta y que utiliza condiciones suaves de operación ( $T=308\text{K}$  y  $P<10\text{MPa}$ ), para la preparación de SUVs de diferente naturaleza.<sup>(47)</sup>

### 3.2 Autoensamblaje de colesterol y CTAB en un medio acuoso

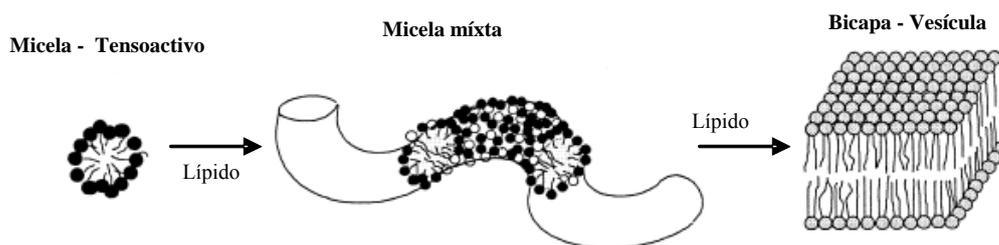
Antes de abordar el desarrollo tecnológico del proceso DELOS-SUSP para preparar SUVs, utilizando el sistema “CTAB/colesterol/agua” como modelo, se consideró necesario realizar un estudio profundo de las diferentes estructuras supramoleculares (mícelas, vesículas, cristales...) que podían formarse en dicho sistema al variar su composición. Gran parte de este estudio se llevó a cabo durante una estancia en el “Equipe Physico-chimie de Systèmes Polyphasés”, UMR CNRS 8612, de la Universidad de Paris-Sud 11, bajo la dirección de la Dra. Angelina Angelova y la Prof. Sylviane Lesieur.



**Figura 3.1.** Representación de las estructuras moleculares del colesterol (A) y CTAB (B).

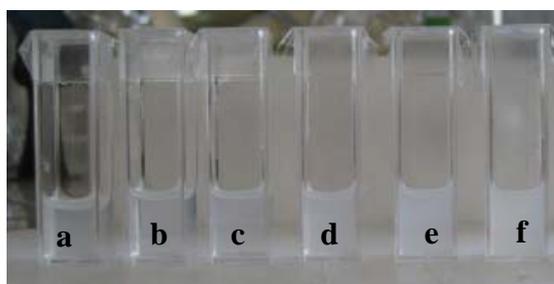
Concretamente, se determinaron las distintas fases que se forman en el sistema CTAB/colesterol en agua, durante la adición progresiva de colesterol sobre un sistema

micelar de moléculas de CTAB en agua, manteniendo constante la concentración de CTAB durante todos los ensayos por encima de su concentración micelar crítica en agua ( $cmc_w=9,2 \cdot 10^{-4}M$ ). De acuerdo con el mecanismo general de transición de micela a vesícula, establecido en la literatura, la transición de fases en este tipo de sistemas con una o más moléculas anfífilicas depende de la geometría de las moléculas y de su composición anfífilica, o relación molar entre ambos componentes (Figura 3.2),<sup>(49)</sup> e implica la formación de toda una serie de organizaciones supramoleculares intermedias fácilmente identificables mediante diversas técnicas de caracterización.<sup>(50)</sup>



**Figura 3.2.** Mecanismo general de transición desde micelas hasta vesículas promovido por la adición progresiva del lípido sobre una solución micelar de un tensoactivo.<sup>(49)</sup>

En la presente Tesis Doctoral para estudiar el autoensamblaje entre moléculas de colesterol y CTAB en fase acuosa, se prepararon mediante la técnica convencional de ultrasonidos toda una serie de mezclas CTAB/colesterol en agua (ver Figura 3.3) en la que se varió sistemáticamente la relación molar de CTAB y colesterol (Q), manteniéndose constante la concentración del CTAB en el medio a 0,01. La concentración de CTAB seleccionada fue unas diez veces superior a la concentración micelar crítica en agua,  $cmc_w$  (ver Parte Experimental).



**Figura 3.3.** Imágenes de los sistemas dispersos CTAB/colesterol en agua preparados por ultrasonidos variando la relación molar de CTAB/colesterol: (a) 10.000, (b) 1.000, (c) 100, (d) 1, (e) 0,66, (f) 0,33.

Tal y como muestra la Figura 3.3, se observó que la apariencia de las dispersiones preparadas cada vez era más translúcida conforme se incrementaba la

concentración de colesterol en el medio, manteniendo constante la de CTAB. Las organizaciones supramoleculares presentes en cada una de esas mezclas CTAB/colesterol (ver Figura 3.3) se caracterizaron mediante las técnicas de espectroscopia de UV-Visible, crio-TEM, dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial  $\zeta$ . Para modelizar las diferentes fases dispersas, intermedias y finales observadas, se aplicó la teoría del parámetro de empaquetamiento molecular. Por último, y en base a los resultados experimentales y teóricos obtenidos, se propuso un posible mecanismo de transición de micela a vesícula para la mezcla anfífilica “CTAB/colesterol” en agua.

### 3.2.1 Caracterización de la organización supramolecular en sistemas “CTAB/colesterol/agua”

#### Caracterización de los distintos sistemas dispersos CTAB/colesterol mediante las técnicas de dispersión de luz dinámica y de microscopia criogénica (crio-TEM)

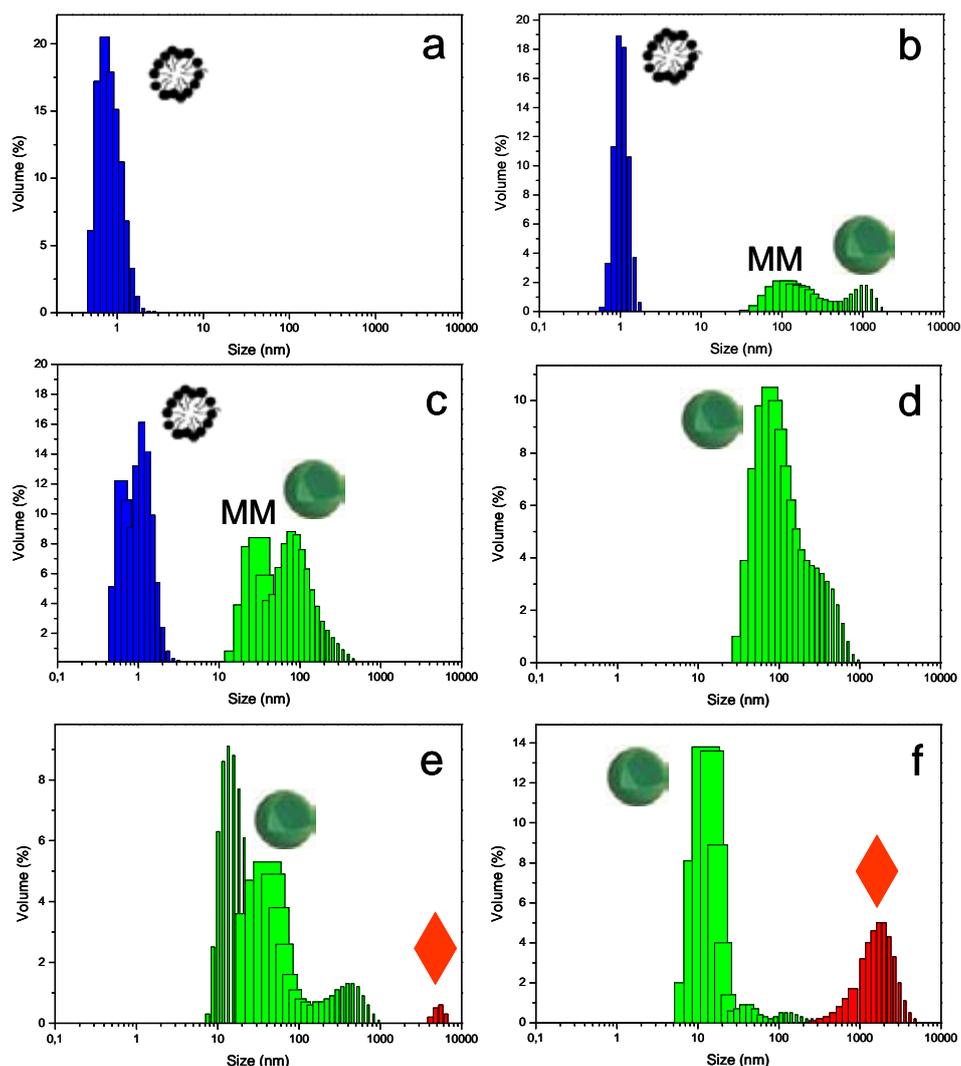
La influencia de la relación molar CTAB/colesterol sobre las diferentes organizaciones supramoleculares que forman las moléculas de CTAB y colesterol en un medio acuoso se estudió por dispersión de luz dinámica (DLS) y mediante microscopia de transmisión electrónica en condiciones criogénicas (crio-TEM). En la Tabla 3.1 se recogen los parámetros operacionales y las características estructurales de esas mezclas CTAB/colesterol preparadas a diferentes relaciones molares CTAB/colesterol manteniendo constante la concentración de CTAB.

**Tabla 3.1.** Distribuciones de tamaños de partícula y estabilidades de sistemas “CTAB/colesterol/agua” preparados a distinta relación de CTAB y colesterol.

| Muestra | Parámetros operacionales              |                   | Distribución de tamaño de partícula <sup>a</sup> |        |        |       | Estabilidad <sup>b</sup> |
|---------|---------------------------------------|-------------------|--|--------|--------|-------|--------------------------|
|         | Q=CTAB/chol <sup>c</sup><br>(mol/mol) | X <sub>chol</sub> | D(0,5) <sup>b</sup>                              |        |        |       | $\zeta$<br>(mV)          |
|         |                                       |                   | Peak 1   |        | Peak 2 |       |                          |
|         |                                       |                   | (%)  | D (nm) | (%)    | D(nm) |                          |
| -       | CTAB puro                             | 0                 | 22   | 1      | -      | -     | +92,1                    |
| a       | 10.000                                | 1·E-04            | 19   | 1      | 3      | 113   | +66,5                    |
| b       | 1.000                                 | 1·E-03            | 17   | 1      | 9      | 80    | +112,0                   |
| c       | 100                                   | 1·E-02            | 32   | 17     | 6      | 80    | +85,7                    |
| d       | 1                                     | 0,50              | 11   | 92     | -      | -     | +77,0                    |
| e       | 0,66                                  | 0,60              | 10   | 14     | 1      | 5358  | +67,3                    |
| f       | 0,33                                  | 0,75              | 14   | 14     | 5      | 4980  | +59,1                    |

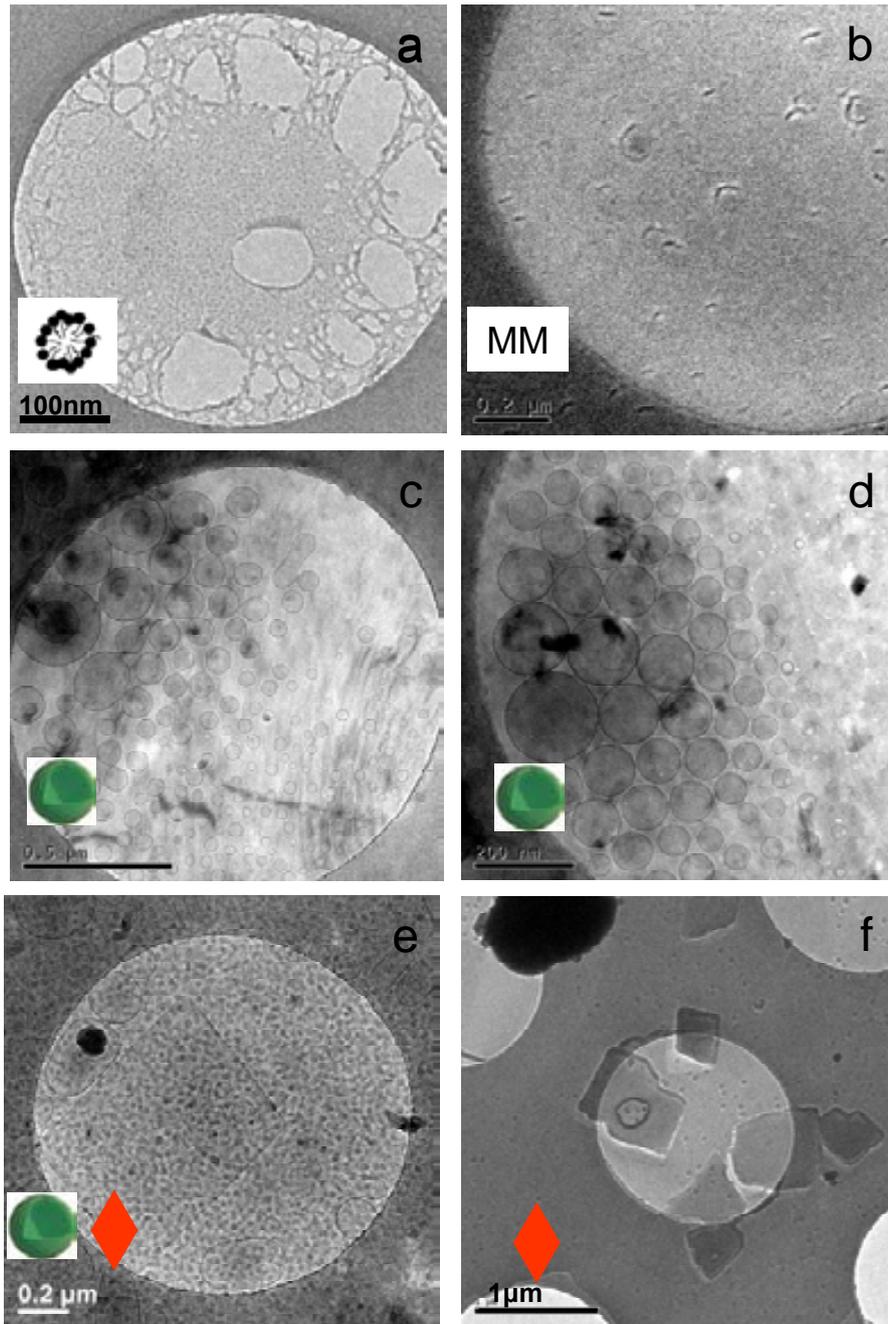
[a] Distribuciones de tamaño de partícula en volumen medidas por la técnica de dispersión de luz dinámica. [b] Diámetro medio de partícula. [c] Estabilidad del sistema disperso definida por el potencial  $\zeta$ . [c] Relación molar de CTAB/colesterol. En todos los sistemas la concentración de CTAB se mantuvo constante a un valor de 0,01M y la temperatura a 298K.

Tal y como se puede observar en la Figura 3.4a, cuando solo está presente el CTAB en el medio, el sistema disperso está formado por micelas de CTAB con un tamaño medio de partícula de 1 nm. Si se incrementa la concentración de colesterol en el medio hasta alcanzar una relación molar de CTAB/colesterol de 10.000, se observan en el sistema dos poblaciones de partículas distintas. Una mayoritaria formada micelas de CTAB con un tamaño medio de 1nm y otra minoritaria que podría ser asignada a micelas mixtas y/o vesículas de CTAB/colesterol de tamaños entre 100 y 1000 nm (Figura 3.4b). Si la relación molar CTAB/colesterol disminuye a  $Q=1.000$ , se observa una disminución de la población de las micelas de CTAB y a su vez un incremento de la población de micelas mixtas y/o vesículas (ver Figura 3.4c). Si se continua disminuyendo dicha relación molar hasta  $Q=100$ , se observa la desaparición de las organizaciones micelares y que la incorporación de más moléculas de colesterol al medio provoca la formación de más micelas mixtas CTAB/colesterol con un diámetro medio centrado en 30 nm y una morfología de tipo “disco” (Figura 3.5b). A una proporción equimolar de CTAB y colesterol, se observa claramente que el sistema está formado principalmente por vesículas con un tamaño medio de 92nm (Figuras 3.4d). Las imágenes de crio-TEM obtenidas para esta fracción molar (Figuras 3.5c-d) confirman la naturaleza vesicular de la fase dispersa poniendo además en evidencia su naturaleza unilamelar. Cuando la proporción de colesterol en el medio es superior a la de CTAB, como ocurre a una fracción molar de  $Q=0,66$ , el sistema está formado por una población de vesículas muy polidispersas en tamaño, y por una pequeña población de objetos con un tamaño medio de la  $6\mu\text{m}$  que probablemente son cristales de colesterol (Figura 3.4e). A esta fracción molar, las imágenes de crio-TEM muestran la coexistencia de vesículas esféricas con diámetros comprendidos entre 43-285nm junto con vesículas alargadas tipo cilíndricas, con una longitud y anchura comprendidas entre 170-360nm y 70-175nm, respectivamente (Figura 3.5e), así como cristales que presentan una morfología de tipo paralelepípedo rectangular con tamaños superiores a la micra. Finalmente, cuando la concentración de colesterol es muy superior a la de CTAB, como por ejemplo a  $Q=0,33$ , la presencia de cristales de colesterol en el medio vesicular es mucho más significativa (Figuras 3.4f y 3.5f).



**Figura 3.4.** Distribuciones de tamaño de partícula medidas por DLS de los diferentes sistemas dispersos CTAB/colesterol, preparados por ultrasonidos variando la relación molar CTAB/colesterol: (a) CTAB puro, (b) 10.000, (c) 1.000, (d) 1, (e) 0,66 y (f) 0,33. Micela, ; Micela mixta, MM; Vesícula, ; Cristal, .

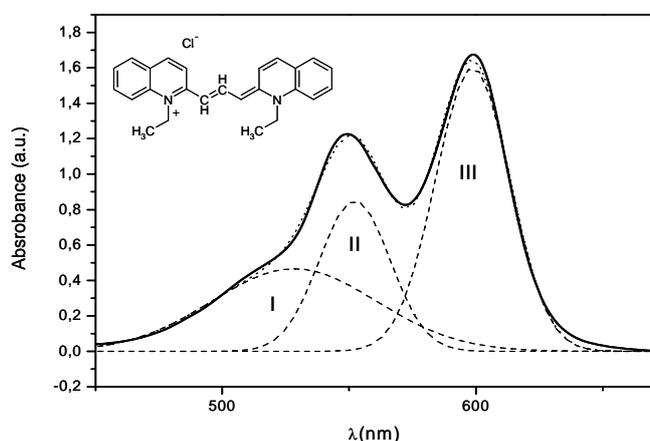
La estabilidad de los distintos sistemas dispersos CTAB/colesterol preparados con diferentes concentraciones de colesterol, manteniendo constante la de CTAB, se estudió mediante medidas del potencial zeta de las dispersiones. Los elevados valores de los potenciales zeta medidos (Tabla 3.1) y que en todos los casos resultaron ser superiores a +30mV, nos revelan que las muestras son muy estables probablemente debido a la carga positiva sobre la superficie de los objetos dispersos, que evita su aglomeración por las repulsiones electroestáticas.



**Figura 3.5.** Imágenes de crio-TEM de los diferentes sistemas dispersos CTAB/colesterol, preparados por ultrasonidos a diferentes relaciones molares CTAB/colesterol: (a) 10.000, (b) 100, (c) y (d) 1, (e) 0,66 y (f) 0,33. Micela, ; Micela mixta, MM; Vesícula, ; Cristal, .

Caracterización de los sistemas dispersos CTAB/colesterol en agua por espectroscopia de UV-Visible y medidas de densidad óptica empleando una sonda solvatocrómica

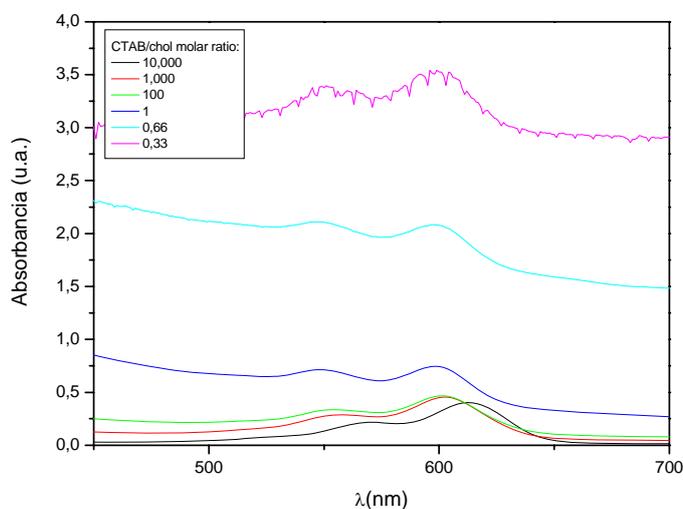
La influencia de la relación molar CTAB/colesterol sobre las diferentes organizaciones supramoleculares alcanzadas se analizó también por espectroscopia de UV-Visible y por medidas de turbidez (densidad óptica) empleando como sonda o indicador solvatocrómico el cloruro de pinacianol (PIN).<sup>(51),(53)</sup> El colorante PIN ha sido utilizado anteriormente con éxito como indicador óptico para el estudio de membranas y sistemas micelares, ya que es muy sensible a la polaridad del medio, produciendo desplazamientos solvatocrómicos de sus máximos de absorción.<sup>(52)</sup> Siguiendo el procedimiento descrito por Estelrich et al.<sup>(52)</sup> el espectro de absorción del PIN en agua se puede descomponer en tres bandas de absorción cuyos máximos están situados aproximadamente a 520, 550 y 600 (Figura 3.6), que indican, tal y como ocurre en otras cianinas, que el PIN se encuentra en disolución en forma libre (monomérica) y asociado como dímero. Cuando el PIN se absorbe en superficies coloidales, como por ejemplo en las membranas lipofílicas de las vesículas, esas tres bandas sufren un desplazamiento solvatocrómico hacia longitudes de onda inferior, disminuyendo también su intensidad (ver Parte Experimental).<sup>(52)</sup>



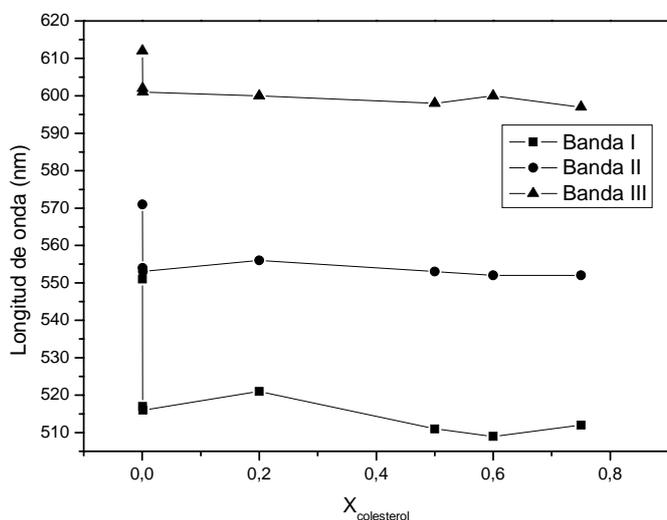
**Figura 3.6.** Espectro de UV-Visible de PIN puro en agua con una concentración de  $1,25 \cdot 10^{-5} \text{M}$  (—). La deconvolución del espectro, mediante una combinación de funciones gaussianas, permite descomponer el espectro en tres bandas I, II y III (---). Ajuste realizado al espectro mediante la suma de las tres funciones gaussianas (···).

En la Figura 3.7 están representados los espectros de absorción del colorante PIN en agua, a una concentración de  $5,6 \cdot 10^{-6} \text{M}$ , en presencia de CTAB con una concentración de 0,01M y de diferentes concentraciones molares de colesterol, estando las relaciones molares de CTAB/ colesterol de las diferentes dispersiones comprendidas entre 0,33 y 10.000, Todos los espectros fueron desconvolucionados como la suma de tres bandas gaussianas. La variación de las longitudes de onda de esas tres bandas, en

función de la fracción molar de colesterol a una concentración de CTAB=0,01, se encuentra representada en la Figura 3.8.



**Figura 3.7.** Espectros de absorción del PIN en agua en presencia de diferentes sistemas dispersos CTAB/colesterol, preparados por ultrasonidos con relaciones molares CTAB/colesterol comprendidas entre 0,33 y 10.000,

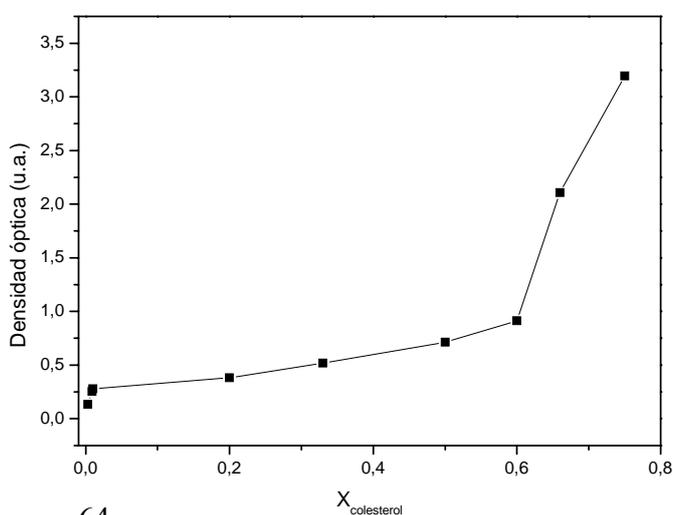


**Figura 3.8.** Variación de la longitud de onda de las tres bandas obtenidas después de la desconvolución del espectro experimental del PIN, en función de la fracción molar de colesterol en los diferentes sistemas dispersos CTAB/colesterol preparados por ultrasonidos.

El desplazamiento hipocrómico que se muestra en la Figura 3.8 para los máximos de las tres bandas, I, II, y III, del colorante indica que se produce un cambio en la polaridad del medio que rodea el cromóforo como consecuencia del incremento de la concentración del colesterol en el medio, sugiriendo que el indicador PIN se sitúa en un ambiente menos polar.<sup>(53),(54)</sup>

Las transiciones estructurales entre los distintos sistemas dispersos CTAB/colesterol, que contienen diferentes cantidades de colesterol, también fueron estudiadas a través de medidas de densidad óptica, determinadas a una longitud de onda de 500nm. La densidad óptica (O.D.) se define como la absorbancia que presenta un determinado elemento óptico a una longitud de onda por unidad de camino óptico del elemento. La longitud de onda ( $\lambda$ ) seleccionada para llevar a cabo las medidas de

densidad óptica, debe ser una en la cual el sistema no absorba. El procedimiento que se ha seguido en el presente trabajo para la medición de este parámetro se encuentra descrito en la Parte Experimental. La variación de la densidad óptica en función de la fracción molar de colesterol a una concentración de CTAB constante de 0,01M, está representada en la Figura 3.9 Cuando la relación molar CTAB/colesterol,  $Q$ , es igual 10.000 ( $X_{\text{chol}}=10^{-4}$ ), el sistema presenta un aspecto homogéneo y transparente con una densidad óptica cercana a 0, lo que es típico para soluciones micelares. Este valor de densidad óptica coincide con el obtenido para micelas de CTAB en agua, libres de colesterol, a la misma concentración. Cuando se incrementa la fracción molar de colesterol, de  $10^{-4}$  a  $10^{-2}$ , correspondiendo a un cambio de relación molar de CTAB/colesterol de 10.000 a 100, el sistema empieza a exhibir un aspecto algo turbio, típico de la formación de objetos de tamaños superiores. Bajo estas condiciones, las micelas de CTAB podrían actuar como una interfase micelar donde las moléculas de colesterol se van solubilizando progresivamente hasta la formación de una estructura de tipo bicapa mixta. En esta zona y para valores de  $X_{\text{chol}}$  alrededor de 0,5, la densidad óptica crece ligeramente como consecuencia de la formación de una nueva organización supramolecular mixta de tamaño nanométrico que dispersa la luz, y está formada por moléculas de CTAB y colesterol. Cuando la relación molar CTAB/colesterol es superior a 1 ( $X_{\text{chol}}>0,5$ ), la densidad óptica empieza a crecer rápidamente, probablemente debido a que las micelas mixtas ya no pueden solubilizar más moléculas de colesterol en sus estructuras. Efectivamente, en la Figura 3.9, se puede observar que a valores de  $X_{\text{chol}}=0,6$  se produce un brusco incremento de la densidad óptica, probablemente como consecuencia de la formación de los primeros cristales sólidos de colesterol, que dispersan la luz de una manera distinta a como lo hacen las micelas mixtas o las vesículas de CTAB y colesterol.

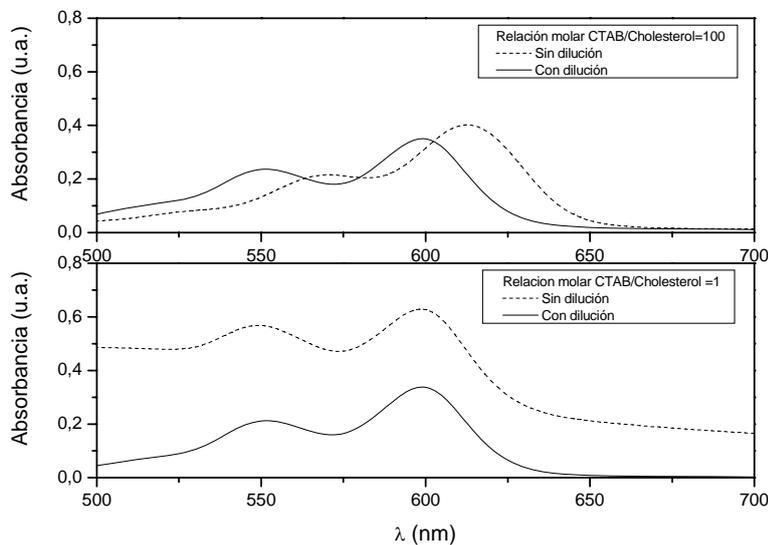


**Figura 3.9.** Variación de la densidad óptica a  $\lambda=500\text{nm}$  en función de la fracción molar de colesterol en los diferentes sistemas “CTAB/colesterol/agua” preparados por ultrasonidos.

Estudio de la estabilidad de los sistemas dispersos CTAB/colesterol frente a un proceso de dilución

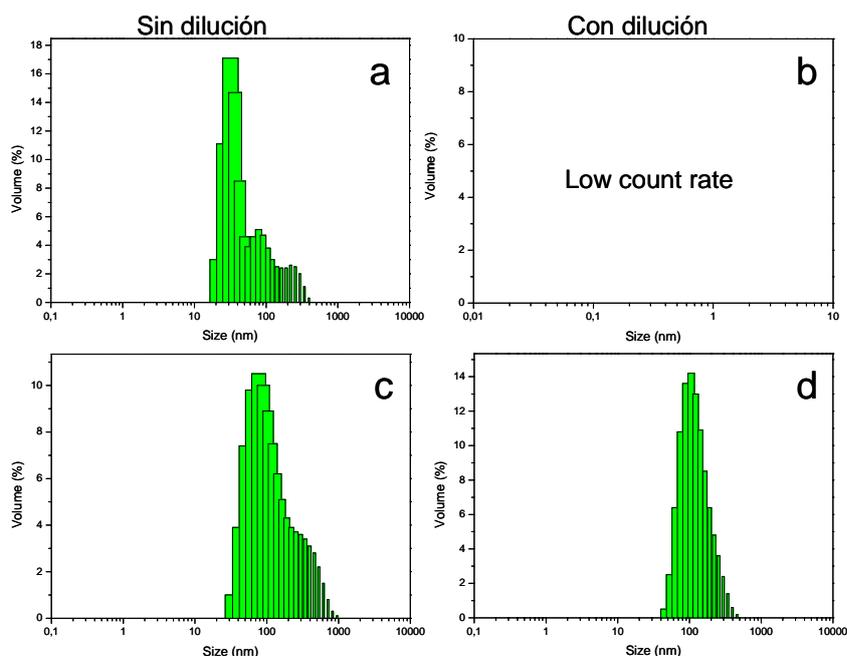
La estabilidad de los sistemas dispersos de CTAB/colesterol se estudió al ser sometidos a un proceso de dilución con agua. Para llevar a cabo este estudio, los sistemas con relaciones molares de CTAB/colesterol de 100 y 1 con una concentración de CTAB igual a 0,01M, fueron sometidos a una dilución 1: 100 con agua ultrapura (MilliQ) y caracterizados por las técnicas de espectroscopia de UV-Visible con el cromóforo PIN como sonda solvatocrómica y dispersión de luz dinámica (DLS).

En la Figura 3.10 se muestran los espectros de absorción visible en agua del PIN a una concentración de  $5,6 \cdot 10^{-6}M$ , en presencia de los sistemas dispersos CTAB/colesterol con fraccionales molares de  $Q=100$  y 1, antes y después de diluirlos 1:100 con agua ultrapura. A una  $Q=100$ , la dilución del sistema produce un desplazamiento hipocrómico de la longitud de onda máxima,  $\lambda_{max}$ , del espectro de absorción del PIN hacia la zona del azul (Figura 3.10 arriba). En cambio, el proceso de dilución no afecta a los máximos de absorción del PIN en presencia de una relación molar de  $Q=1$  (Figura 3.10 abajo).



**Figura 3.10.** Espectros de absorción visible del cromóforo PIN con una concentración de  $5,6 \cdot 10^{-6}M$  en presencia de los sistemas dispersos CTAB/ colesterol preparados por ultrasonidos con relaciones molares CTAB/colesterol de 100 (arriba) y 1 (abajo) sin dilución (---), y después de diluir 1:100 el sistema con agua destilada (—).

Tal y como se puede observar en la Figura 3.11b, cuando se diluye el sistema preparado a  $Q=100$ , la técnica de dispersión de luz dinámica no es capaz de detectar ninguna estructura en el medio. Sin embargo, el proceso de dilución no afecta estructuralmente el sistema disperso formado a  $Q=1$ , tal y como se puede ver en la Figura 3.11d.



**Figura 3.11.** Distribuciones de tamaño de partícula en volumen medidas por la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) de los sistemas dispersos CTAB/colesterol preparados por ultrasonidos con relaciones molares CTAB/colesterol de 100 y 1 antes (a y c), y después de diluir 1:100 el sistema con agua ultrapura (b y d).

La variación en el comportamiento de ambos sistemas ( $Q=100$  y 1) con la dilución, observada por DLS y espectroscopia de absorción con el PIN, refleja la presencia de diferentes organizaciones supramoleculares CTAB/colesterol en los dos sistemas. De hecho, cuando la relación CTAB/colesterol es de 100, las micelas dominan por completo el comportamiento del sistema cuando las concentraciones de CTAB son superiores a la micelar crítica. En cambio, cuando el sistema es diluido 100 veces con agua, alcanzando una concentración de CTAB inferior a la micelar crítica, las micelas se disocian en monómeros del tensoactivo, no detectables por DLS. Asimismo, la dimerización del PIN se ve favorecida cuando las micelas no están presentes en el medio, observándose un desplazamiento hipocrómico de la  $\lambda_{\max}$  hacia longitudes de onda más pequeñas. En contraste, la distribución de tamaños de partícula y el espectro de absorción del cromóforo PIN del sistema preparado a  $Q=1$ , permanecen prácticamente iguales después de la dilución. Esto indica, que la estructura presente en el medio, formada a partir del sistema anfifílico CTAB/colesterol, es de tipo vesicular, ya que no se disocia en monómeros después de su dilución con agua, y permanece como un objeto cerrado estable.

### 3.2.2 Modelo del parámetro de empaquetamiento molecular aplicado al sistema CTAB/colesterol

En los últimos años, el modelo teórico del parámetro de empaquetamiento molecular ha sido muy empleado en la literatura, ya que permite comprender de una manera simple e intuitiva los fenómenos de auto-ensamblaje entre moléculas anfifílicas.<sup>(55)</sup> Isrealachvili et al. (1976) propusieron el concepto del parámetro de empaquetamiento,<sup>(57)</sup> y demostraron como el tamaño y la forma de la estructura que adopta un anfifílico, o una mezcla de ellos, en una fase acuosa se podía racionalizar en base a una combinación de principios generales termodinámicos y de consideraciones de empaquetamiento molecular. Dichos autores también fueron capaces además de explicar porque los tensoactivos y los lípidos forman agregados en una fase acuosa, y dar las razones porque no crecen infinitamente, sino que lo hacen de forma finita en tamaño y porque adquieren una forma determinada.<sup>(56)</sup>

En el presente trabajo se ha utilizado dicho modelo teórico para justificar las diferentes organizaciones supramoleculares adoptadas por las moléculas de colesterol y CTAB en las diferentes mezclas anfifílicas tensoactivo/lípido estudiadas.

El parámetro de empaquetamiento molecular ( $f$ ) de un compuesto anfifílico se define como,

$$f = v / al \quad (1)$$

donde  $v$  es el volumen de la cola hidrocarbonada,  $l$  es la longitud de la cadena hidrocarbonada extendida, y  $a$  es el área óptima de la cabeza polar del anfifílico. Para la definición del parámetro de empaquetamiento de un compuesto anfifílico se tienen en cuenta sus energías libres de interacción, la geometría molecular y la entropía. De acuerdo a la literatura, se ha observado que los compuestos anfifílicos forman micelas cuando el parámetro de empaquetamiento es  $f < 1/3$ , micelas no esféricas cuando éste adquiere valores comprendidos entre  $1/3 < f < 1/2$ , bicapas planas (vesículas) cuando lo hace entre  $1/2 < f < 1$ , y micelas inversas o fases hexagonales para valores de  $f > 1$ .<sup>(58)</sup>

En la Tabla 3.2 están recogidos los parámetros moleculares y estructurales usados para la estimación de los parámetros de empaquetamiento individuales,  $f_i$ , de las moléculas de CTAB y colesterol. Los parámetros del colesterol ( $a$ ,  $v$ , y  $l$ ) fueron tomados directamente de la literatura.<sup>(59)</sup>

**Tabla 3.2.** Parámetros moleculares y de empaquetamiento de las moléculas de CTAB y colesterol.<sup>(58)</sup>

| Anfifílico                          | CTAB   | Colesterol |
|-------------------------------------|--------|------------|
| $l$ [nm] <sup>a</sup>               | 1,93   | 1,73       |
| $v$ [nm <sup>3</sup> ] <sup>b</sup> | 0,54   | 40,00      |
| $a$ [nm <sup>2</sup> ] <sup>c</sup> | 0,64   | 1,90       |
| $M$ [g/mol] <sup>d</sup>            | 364,46 | 386,66     |
| $f_i$                               | 0,42   | 1,22       |

[a]  $l$ , es la longitud de la cadena hidrocarbonada extendida. [b]  $v$ , es el volumen de la cadena hidrocarbonada. [c]  $a$ , es el área de la cabeza hidrofílica de la molécula. [d]  $M$ , peso molecular. Todos los parámetros están estudiados a 20°C.

Tal y como se esperaba, la molécula de colesterol se caracteriza por un parámetro de empaquetamiento  $f_i > 1$ , debido a su forma tipo cono, por lo que adopta fases hexagonales cuando se hidrata. Respecto al CTAB, el área de la cabeza polar ( $a$ ) de la molécula se obtuvo en la literatura,<sup>(60)</sup> mientras que el volumen ( $v$ ) y la longitud ( $l$ ) de la cola hidrocarbonada fueron calculados usando las siguientes ecuaciones,

$$v = (27,4 + 26,96n_c) \cdot 10^{-3} \text{ (nm}^3\text{)} \quad (2)$$

$$l = (0,154 + 0,1265n_c) \cdot 0,77 \text{ (nm)} \quad (3)$$

donde  $n_c$  es el número total de carbonos de la cadena alquílica.<sup>(61)</sup> El parámetro de empaquetamiento estudiado para el CTAB,  $f_{\text{CTAB}} = 0,42$ , sugiere que el CTAB forma micelas no esféricas en un medio acuoso ya que está comprendido entre  $1/3 < f < 1/2$ .

La estructura supramolecular, formada mediante la hidratación de una mezcla de anfifílicos en agua, puede ser predicha cualitativamente mediante la estimación del parámetro de empaquetamiento medio,  $F_m$ , definido a través de la ecuación,

$$F_m = \sum_i x_i \cdot f_i \quad (4)$$

donde  $x_i$  es la fracción molar de cada componente  $i$  en la mezcla, y  $f_i$  es parámetro individual de empaquetamiento del componente  $i$ .<sup>(62)</sup> El concepto del parámetro de empaquetamiento medio, solo es aplicable a aquellas mezclas de anfifílicos cuyos componentes se ensamblen en una fase liotrópica mixta, es decir, que no coexisten como fases separadas en el medio. Asimismo, se debe tener en cuenta que la definición de  $F_m$  se basa en un mezclado “ideal” entre sus componentes, y no se tienen en cuenta posibles interacciones moleculares específicas entre ellos.

En nuestro caso, las diferentes mezclas CTAB/colesterol cumplen este requisito, por lo que, mediante la ecuación 4 fueron estimados los parámetros de

empaquetamiento medios,  $F_m$ , de los diferentes sistemas CTAB/colesterol, los cuales se encuentran recogidos en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Parámetros de empaquetamiento medio,  $F_m$ , de las diferentes mezclas CTAB/colesterol estimados de acuerdo a la ecuación 4.<sup>(62)</sup>

| CTAB/Cholesterol relación molar | 10.000/1 | 1.000/1 | 100/1  | 1/1  | 1/1.5 | 1/3  |
|---------------------------------|----------|---------|--------|------|-------|------|
| $X_{col}$                       | 1·E-04   | 1·E-03  | 1·E-02 | 0,5  | 0,6   | 0,75 |
| $X_{CTAB}$                      | 0,9999   | 0,999   | 0,99   | 0,5  | 0,4   | 0,25 |
| $F_m$                           | 0,4201   | 0,421   | 0,428  | 0,82 | 0,91  | 1,02 |

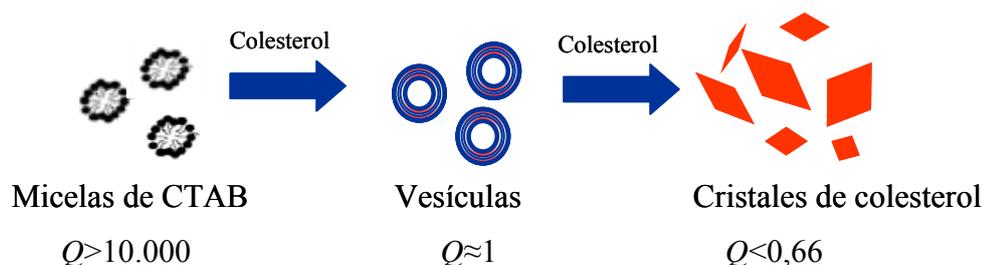
Los parámetros de empaquetamiento individuales,  $f_i$ , del CTAB y colesterol son 0,42 y 1,22, respectivamente.

Los resultados de la Tabla 3.3 nos revelan que el parámetro de empaquetamiento medio,  $F_m$ , predice una organización supramolecular predominante de tipo micela no esférica ( $1/3 < F_m < 1/2$ ) para aquellos sistemas dispersos preparados con relaciones molares CTAB/colesterol comprendidas entre 10.000 y 100, de tipo bicapa plana, como las vesículas ( $1/2 < F_m < 1$ ) para las relaciones molares CTAB/colesterol comprendidas entre 1 y 0,66, y de tipo fase hexagonal ( $F_m > 1$ ) para una relación molar CTAB/colesterol de 1,02.

En base a estas consideraciones, se puede decir que la predicción teórica de los diferentes organizaciones supramoleculares alcanzados por la mezcla anfifílica CTAB/colesterol a diferentes relaciones molares CTAB/colesterol, según el modelo de Isrealachvili et al., concuerda con los resultados experimentales obtenidos.

### 3.2.3 Mecanismo de transición de micela a vesícula para el sistema CTAB/colesterol

En base a los resultados experimentales obtenidos en este trabajo, se ha propuesto un proceso de tres etapas para describir el mecanismo de transición de micela a vesícula (Figura 3.2) para la mezcla anfifílica CTAB/colesterol, inducido por la adición progresiva de colesterol sobre una disolución micelar de CTAB. La transición de fases en este sistema ha implicado la formación de toda una serie de organizaciones supramoleculares finales e intermedias, que han sido fácilmente identificadas por las técnicas de caracterización utilizadas (ver Figura 3.12).



**Figura 3.12.** Esquema de las diferentes estructuras supramoleculares adoptadas por las moléculas de CTAB y colesterol en un medio acuosa en función de su relación de composición ( $Q$ ).

En una primera etapa, cuando la relación molar CTAB/colesterol es muy superior a 1, las moléculas de colesterol se solubilizan en las micelas de CTAB de elevada curvatura, dando lugar a la formación de micelas mixtas de CTAB y colesterol, tal y como el modelo del parámetro de empaquetamiento predice ( $1/3 < F_m < 1/2$ ). Este hecho, se confirmó por las imágenes de crio-TEM y con los experimentos de dilución de las muestras con agua, en los cuales se observa que el sistema disperso CTAB/colesterol de tipo micelar se disuelve en un exceso de medio acuoso, y por tanto, no está formado por objetos cerrados. Cuando se incrementa la concentración de colesterol, el radio de curvatura de las micelas mixtas cambia, debido a la incorporación de más colesterol en la estructura molecular. Las micelas mixtas crecen en tamaño y se alargan para formar micelas tipo cilíndricas. A partir de un cierto radio de curvatura crítico, la agregación en forma de micelas mixtas ya no es posible, y la formación de vesículas se convierte en termodinámicamente favorable. En la segunda etapa intermedia, las micelas mixtas de CTAB/colesterol coexisten con vesículas formadas por una bicapa de CTAB/colesterol. Esta segunda etapa se caracteriza por un incremento de la densidad óptica (las vesículas dispersan la luz un orden de magnitud más que las micelas mixtas), y también por un desplazamiento solvatoacrómico de 12nm de las bandas de máxima de absorción del cromóforo PIN. La transición de fase comienza cuando las micelas mixtas se saturan con el colesterol, y termina cuando la última micela mixta se transforma en vesículas a la relación molar CTAB/colesterol igual a 1. Las vesículas obtenidas son muy estables, tal y como lo muestran los elevados valores de potencial zeta, y los ensayos de dilución con un exceso de agua, que confirman que son estructuras cerradas formadas por una bicapa. Esta fase final concuerda perfectamente con la organización supramolecular tipo lamelar predicha por el parámetro de empaquetamiento medio a  $Q=1$  ( $1/2 < F_m < 1$ ).

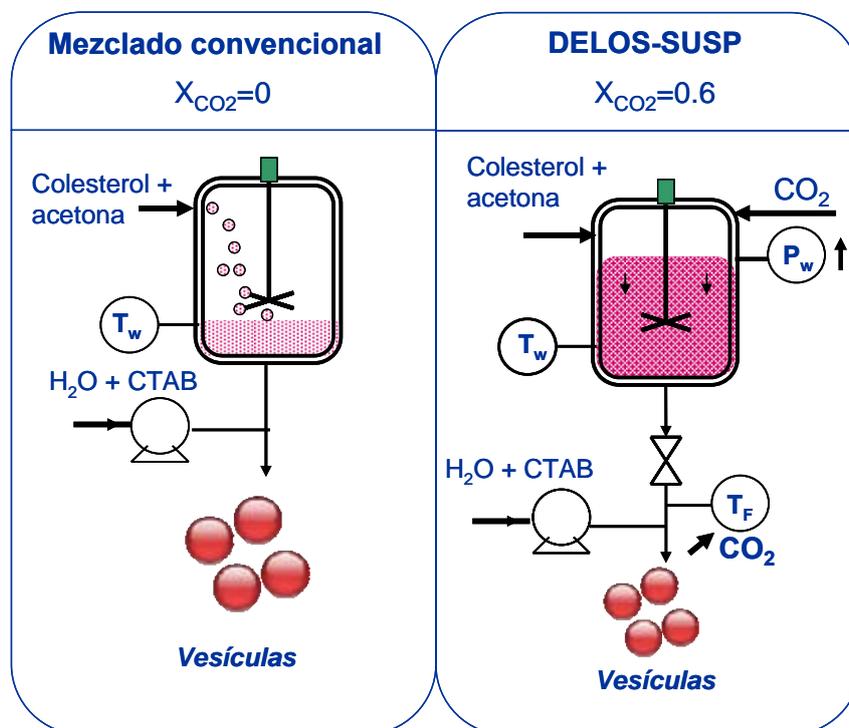
Para composiciones (relación molar CTAB/colesterol $<1$ ) donde hay un menor número de moléculas de CTAB en comparación con las de colesterol, se propone una tercera etapa de acuerdo con las medidas de densidad óptica obtenidas. Esta etapa se caracteriza por la coexistencia de vesículas CTAB/colesterol y de cristales de colesterol. El colesterol empieza a precipitar como un sólido cristalino, cuando el número de moléculas de CTAB presentes en el medio son insuficientes para solubilizar y auto-ensamblar las moléculas de colesterol disponibles. En esta etapa se produce un incremento muy brusco de la densidad óptica, relacionado con la dispersión de la luz provocada por los cristales grandes de colesterol que se forman, cuya presencia se confirmó a través de las imágenes de crio-TEM. Para una relación molar CTAB/colesterol superior a 1, el parámetro de empaquetamiento medio predice fases de tipo hexagonales ( $F_m > 1$ ) como organización supramolecular predominante en el sistema disperso, la cual corresponde a todas las moléculas de colesterol no ensambladas por las moléculas de CTAB.

En resumen, se puede decir que el auto-ensamblaje espontáneo de las moléculas de CTAB y colesterol es capaz de generar un sistema vesicular catiónico. El mecanismo de transición de fases propuesto, en el que se postula la formación de vesículas mixtas de CTAB y colesterol como fase intermedia entre micelas y vesículas, es coherente con el modelo que explica el auto-ensamblaje de mezclas anfífilicas en fase acuosa establecido en la literatura. El tensoactivo catiónico CTAB crea una interfase micelar adecuada para la acomodación de moléculas de colesterol, hasta la saturación de las micelas por el colesterol. El colesterol embebido favorece la formación de estructuras tipo bicapa, y además estabiliza las bicapas catiónicas en el estado final.

### **3.3 Preparación de vesículas CTAB/colesterol por DELOS-SUSP: comparación con el proceso de precipitación convencional por mezclado**

Tal y como se describe en el apartado anterior, en los sistemas “CTAB/colesterol/agua” con relaciones molares de CTAB/colesterol cercanas a 1 y con una concentración de  $CTAB > cmc_w$ , las organizaciones supramoleculares que se detectan corresponden a sistemas vesiculares. En la presente Tesis Doctoral, se prepararon estos sistemas mediante la tecnología DELOS-SUSP y por mezclado

convencional, y se estudió la influencia del tipo de procesado sobre las características estructurales de dichos sistemas (ver Figura 3.13).



**Figura 3.13.** Diagramas de flujo del reactor empleado en los experimentos DELOS y por mezclado convencional.

En la metodología convencional de mezclado, la formación de las vesículas se da por la acción antisolvente de una fase acuosa, que contiene el CTAB, sobre una disolución del colesterol en un disolvente orgánico.<sup>(48)</sup> Para comparar la eficiencia entre ambos métodos de preparación, se realizaron experimentos utilizando la misma configuración experimental esquematizada en la Figura 2.10. Ahora bien, mientras que en el método DELOS-SUSP, inicialmente la disolución orgánica se expande con CO<sub>2</sub> para su posterior despresurización antes de mezclarse con la fase acuosa, en la metodología convencional, el mezclado entre la disolución inicial y la fase acuosa se realiza directamente sin una previa expansión de la fase orgánica. En ambos experimentos se emplearon disoluciones iniciales de colesterol en acetona con la misma  $\beta_i$  y se mantuvo constante la relación entre los volúmenes de disolución orgánica inicial y la fase acuosa. En la Tabla 3.4 están recogidas las características estructurales de los sistemas vesiculares obtenidos por mezclado convencional y por DELOS-SUSP. Empleando en ambos casos disoluciones iniciales de colesterol en acetona con  $\beta_i=0,9$ ,

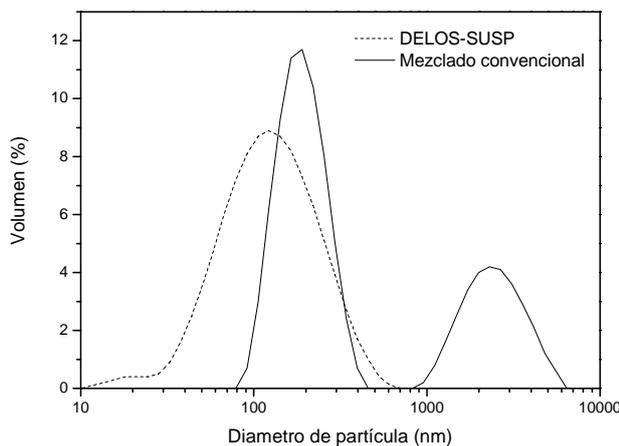
una relación molar entre colesterol y CTAB de  $Q=1$  y una concentración de CTAB en la fase acuosa de un 1% (v).

**Tabla 3.4.** Obtención de vesículas “CTAB/colesterol” en fase acuosa mediante DELOS-SUSP y por mezclado convencional

| Experimento | Proceso               | $X_{CO_2}$ | $\Delta T^a$<br>(°C) | Rendimiento <sup>b</sup><br>(%) | Tamaño                      |                  | Estabilidad       |                                |         |
|-------------|-----------------------|------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------|------------------|-------------------|--------------------------------|---------|
|             |                       |            |                      |                                 | D(0,5) <sup>c</sup><br>(nm) | I.U <sup>d</sup> | $\zeta^e$<br>(mV) | $V_s^f$<br>( $\mu\text{m/s}$ ) | Estable |
| NS59        | Mezclado <sup>g</sup> | 0          | 0                    | 100                             | 301                         | 3,9              | +31,3             | 1,17                           | Si      |
| NS98        | DS <sup>h</sup>       | 0,6        | -55                  | 92                              | 170                         | 5,3              | +87,4             | 0,57                           | Si      |

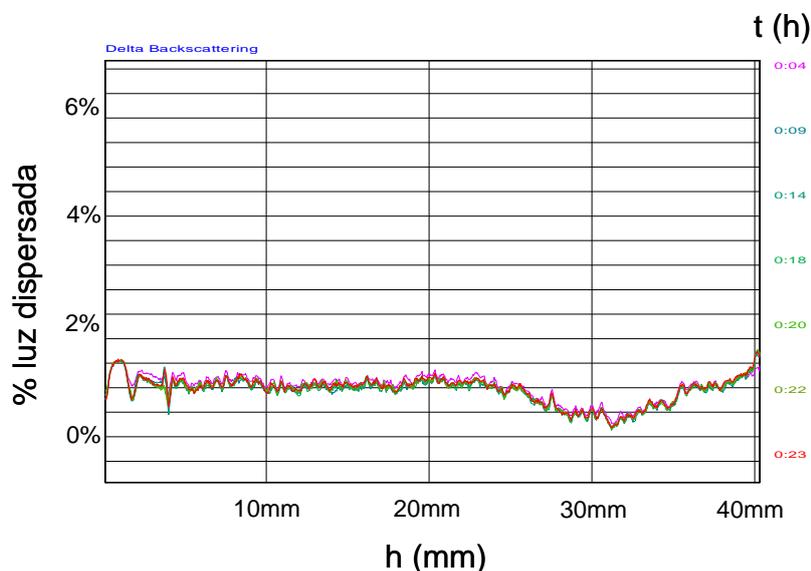
[a] Descenso de temperatura medido durante la despresurización. [b] Rendimiento del proceso en %. [c] Diámetro medio de partícula en volumen medido por DLS. [d] Índice de uniformidad de la muestra (%). [e] Potencial zeta. [f] Velocidad de sedimentación. [g] Vesículas obtenidas por mezclado convencional a presión atmosférica,  $T_w=308\text{K}$ , y  $\beta_r=0,9$ , [h] Vesículas obtenidas por DELOS-SUSP a  $P_w=10\text{MPa}$ ,  $T_w=308\text{K}$ ,  $\beta_r=0,9$ . [h] Condiciones de operación: [CTAB]=1% en volumen, Volumen fase acuosa=1200mL, Volumen disolución orgánica=160mL.

Tal y como muestran los resultados de dispersión de luz dinámica de la Tabla 3.4 y la Figura 3.14, mediante el proceso DELOS-SUSP (NS98) es posible obtener vesículas con una distribución de tamaños de partícula más pequeñas y más estables que las obtenidas mediante un método de mezcla directa (NS59). Así en la Figura 3.14 se observa que la distribución de tamaños de partícula del sistema vesicular obtenido por mezclado convencional es bimodal, con dos poblaciones de partículas de tamaño diferentes, cuya mediana es de 301 nm. Contrariamente, las vesículas obtenidas por el método DELOS-SUSP, tiene una distribución de tamaños de partícula unimodal con una mediana centrada en 170nm. A partir del análisis de los valores del potencial zeta de los dos sistemas vesiculares obtenidos, se observa que el sistema vesicular obtenido por mezclado tiene un valor de potencial bastante inferior al de la dispersión obtenida por el proceso DELOS-SUSP, lo que indica una menor estabilidad de dicho sistema.

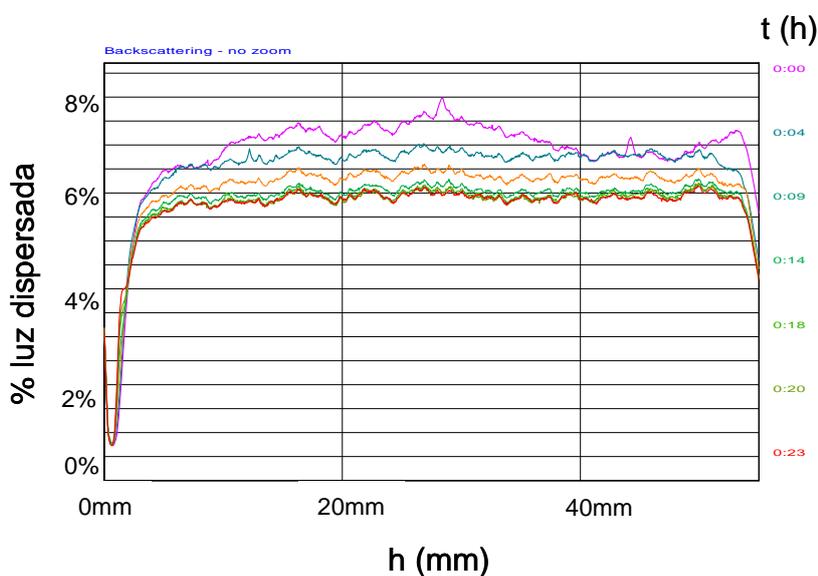


**Figura 3.14.** Curvas de distribución de tamaños de partícula medidas por DLS de los sistemas vesiculares “colesterol/CTAB/acetona/H<sub>2</sub>O” obtenidos por DELOS-SUSP y por mezclado convencional.

Estos sistemas vesiculares (NS59 y NS9) también fueron analizados en un analizador óptico de estabilidad de dispersiones líquidas, siguiendo el procedimiento descrito en la Parte Experimental.



**Figura 3.15.** Variación con el tiempo del % de luz dispersada a distintas alturas (h) del vial que contiene el sistema vesicular “colesterol/CTAB/acetona/agua” obtenido por DELOS-SUSP.

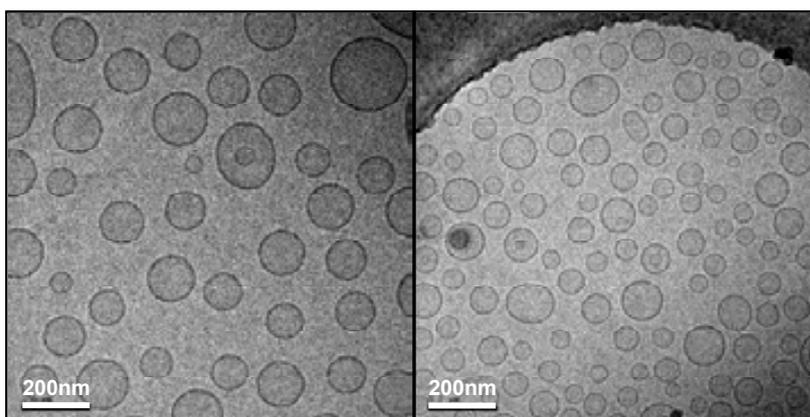


**Figura 3.16.** Variación con el tiempo del % de luz dispersada a distintas alturas (h) del vial que contiene el sistema vesicular “colesterol/CTAB/acetona/agua” obtenido por mezclado convencional.

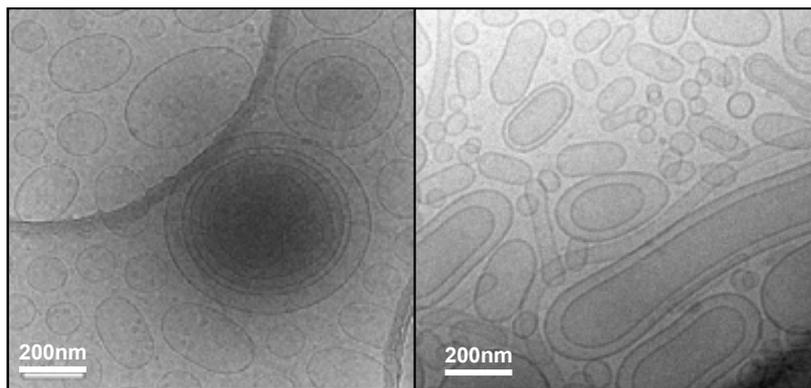
Los perfiles de dispersión de luz obtenidos para cada una de los sistemas vesiculares (ver Figuras 3.15, 3.16), muestran que las vesículas obtenidas mediante el proceso DELOS-SUSP son muy estables, ya que sus perfiles se mantuvieron constantes a lo largo de todo el tiempo de barrido, quedando prácticamente todos solapados entre

sí. En cambio, al analizar el sistema vesicular obtenido por mezclado se observó una variación a lo largo del tiempo de la luz dispersada, en toda la altura de la muestra, lo que indica que el tamaño de la fase dispersa crece por coagulación o floculación, provocando finalmente su sedimentación. A partir de los perfiles de dispersión, representados en las Figuras 3.15 y 3.16, se determinaron las cinéticas de sedimentación de cada una de las dos dispersiones, obteniéndose que la velocidad de sedimentación para el sistema vesicular obtenido por mezclado convencional era casi el doble, 1,17  $\mu\text{m/s}$ , que la observada para el sistema preparado por DELOS-SUSP, 0,57  $\mu\text{m/s}$ .

La morfología y estructura de las vesículas de colesterol y CTAB obtenidas en los experimentos de la Tabla 3.4, también se observó mediante microscopía de transmisión electrónica en condiciones criogénicas. En primer lugar, es importante señalar que los tamaños de partícula medidos por DLS y los observados por crio-TEM concuerdan en todos los casos, estando éstos comprendidos entre 50-500nm. Las imágenes de crio-TEM muestran que mediante el proceso DELOS-SUSP se obtienen vesículas unilamelares pequeñas (“SUV”) muy homogéneas tanto en tamaño como en morfología (Figura 3.17). En cambio, las imágenes correspondientes a las dispersiones obtenidas por mezclado convencional, muestran que éstas también están formadas por vesículas, pero de morfología esférica y elipsoidal, y con una distribución de tamaños de partícula mucho menos homogénea, comprendida entre 50 y 400nm. Además con ese procedimiento convencional muchas de las vesículas obtenidas son multicapa (multivesicular vesicles “MVV”) dando lugar a estructuras con un ordenamiento interno parecido al de una cebolla (Figura 3.18).



**Figura 3.17.** Imágenes de crio-TEM del sistema vesicular “colesterol/CTAB/acetona/agua” obtenido por DELOS-SUSP.

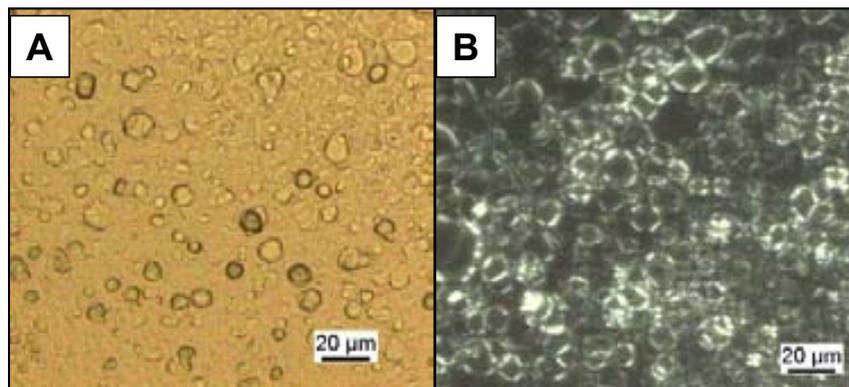


**Figura 3.18.** Imágenes de crio-TEM del sistema vesicular “colesterol/CTAB/acetona/agua” obtenido por mezclado convencional.

También se analizó la estructura supramolecular de los sistemas vesiculares CTAB/colesterol obtenidos por DELOS-SUSP (NS98) y mezclado convencional (NS59) por microscopía óptica por luz transmitida/polarizada y difracción de rayos X a ángulos pequeños y grandes (*Small and Wide Angle X-ray Scattering* (SAXS y WAXS). Este último estudio se llevó a cabo en colaboración con el Departamento de Química Coloidal i Interfacial del Institut d’Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona (IIQAB-CSIC), bajo la dirección de Dr. Jordi Esquena y la Prof. Conxita Solans.

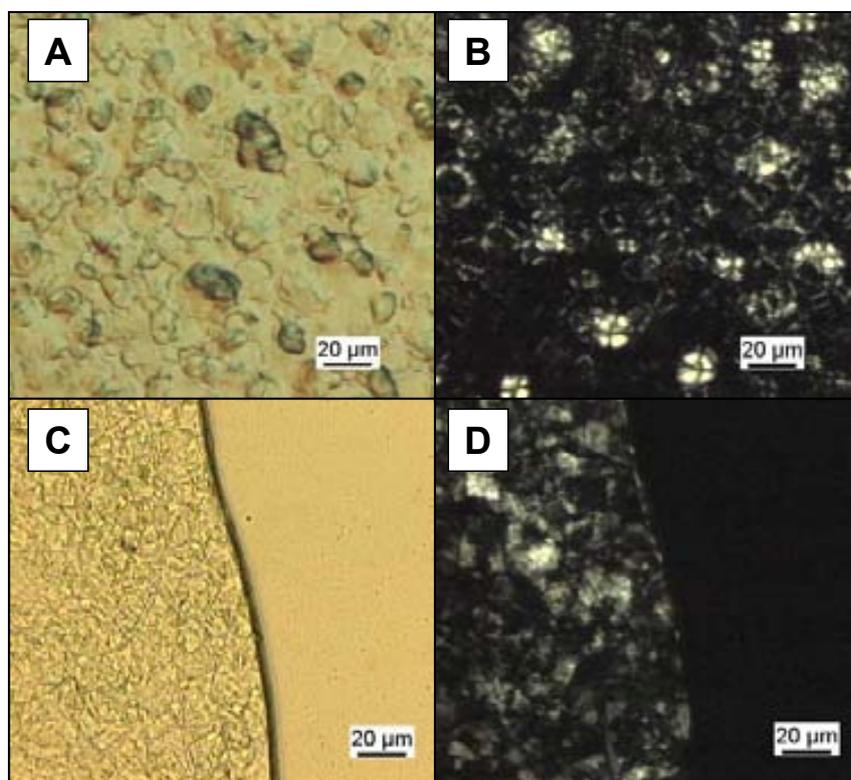
Para llevar a cabo este estudio, 10g de los sistemas vesiculares obtenidos en los experimentos NS59 y NS98 se centrifugaron a 20,000 rpm durante 1 hora, y la fase sedimentada se analizó por microscopía óptica (luz transmitida/polarizada) y SAXS-WAXS siguiendo el procedimiento descrito en la Parte Experimental.

La imagen de microscopía óptica por luz transmitida obtenida del sistema vesicular preparado por DELOS-SUSP (Figura 3.19A) muestra que dicho sistema está formado por vesículas, muy robustas, ya que su estructura se ha mantenido íntegra después del ciclo de centrifugación. Asimismo, la imagen de microscopía óptica por luz polarizada confirma esa estructura tipo vesicular, ya que muestra la birrefringencia típica de los cristales líquidos (cruces de malta) asociada a vesículas (Figura 3.19B)



**Figura 3.19.** Imágenes de microscopía óptica por transmisión (A) y luz polarizada (B) del sistema vesicular “colesterol /CTAB/acetona/agua” obtenido por DELOS-SUSP.

En contraste, las imágenes de microscopía óptica del sistema preparado por mezclado convencional (Figura 3.20) nos revelan que dicho sistema presenta dos organizaciones supramoleculares distintas, vesículas y cristales sólidos. Las imágenes de microscopía por luz polarizada así lo confirman, ya que muestran la birrefringencia típica de cristales líquidos (cruces de malta) asociada a vesículas (Figura 3.20B), y la de cristales sólidos de colesterol (Figura 3.20D).

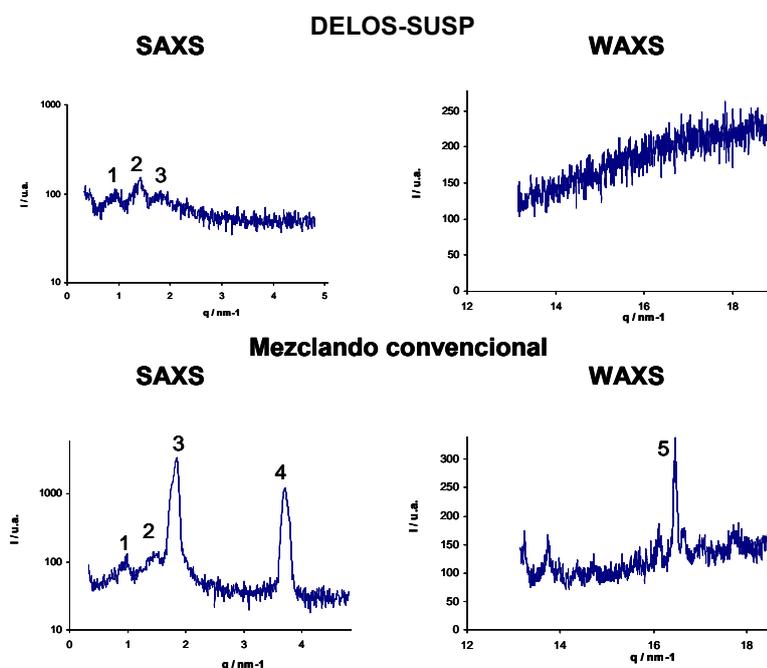


**Figura 3.20.** Imágenes de microscopía óptica por transmisión (A y C) y luz polarizada (B y D) del sistema vesicular “colesterol /CTAB/acetona/agua” obtenido por mezclado convencional.

La fase lipídica separada por centrifugación en las muestras NS98 y NS59, también fue analizada por difracción de rayos X a ángulos pequeños y grandes, para confirmar la composición de fases de los sistemas y el grosor de la membrana.

El espectro de difracción de rayos X a ángulos pequeños del sistema vesicular obtenido por DELOS-SUSP (Figura 3.21), muestra dos picos (**1** y **2**) que podrían ser atribuidos a una estructura de tipo lamelar (láminas paralelas) con una distancia de repetición entre capas paralelas de 7.4nm que correspondería al grosor de la bicapa. También se observa en esa muestra otro pico, el pico **3**, que podría ser indicativo de la presencia de una pequeña proporción de cristales. La poca presencia de sólidos cristalinos se confirmó mediante su espectro de rayos X a ángulos grandes (WAXS), donde no se distingue ninguna señal significativa, indicando que dicho sistema se muestra mayoritariamente amorfo a ángulos grandes.

En cambio, en el espectro de difracción de rayos X a ángulos pequeños del sistema obtenido por mezclado convencional en el experimento NS59 (Figura 3.21), se observa la presencia de 4 picos. Los dos primeros picos (**1** y **2**) se podrían atribuir a la estructura lamelar de las vesículas con una distancia de repetición entre capas paralelas entorno a 6.18nm. Los picos **3** y **4** indican la presencia de un sólido cristalino ordenado en capas paralelas (estructura laminar), cuya presencia se confirma por la observación de un máximo (pico **5**) a ángulos grandes.



**Figura 3.21.** Espectros de difracción de rayos X a ángulos pequeños (SAXS) y grandes (WAXS) obtenidos para el sistema vesicular “colesterol/CTAB/acetona/agua” obtenido por DELOS-SUSP y mezclado convencional.

En resumen, la muestra procesada por DELOS-SUSP está formada únicamente por vesículas, tal y como se desprende de la estructura tipo cristal líquido lamelar, determinada por microscopía y difracción a ángulos pequeños. En cambio, el sistema disperso preparado por mezclado convencional, está formado por una mezcla de vesículas y cristales sólidos de colesterol.

Las vesículas presentes en los sistemas obtenidos por mezclado convencional son de morfología multilamelar y con una distribución de tamaños ancha. Ahora bien, mediante el proceso DELOS-SUSP se producen en una sola etapa, vesículas unilamelares, de dimensiones nanoscópicas y con una morfología muy uniforme, es decir, de tipo SUVs.

Este resultado es de gran relevancia tecnológica, pues la utilización de los sistemas vesiculares como vehículos adecuados para el transporte de activos, depende enormemente del desarrollo de procedimientos capaces de obtener en un solo paso vesículas de tipo SUVs.<sup>(63)</sup>

### **3.4 Influencia de los parámetros de operación sobre las características de las vesículas CTAB/colesterol obtenidas por DELOS-SUSP**

Para identificar cuales son los parámetros operacionales del proceso DELOS-SUSP más importantes que gobiernan la formación de las vesículas de tipo SUVs “CTAB/colesterol” en fase acuosa, así como su estabilidad en el medio, se realizaron una serie de experimentos utilizando el sistema “colesterol/CTAB/acetona/ agua/CO<sub>2</sub>”, en los que se varió de manera sistemática: la fracción molar de CO<sub>2</sub>, y la concentración de colesterol en la disolución inicial ( $\beta_i$ ). En todos esos experimentos se analizó la influencia de la variación de cada uno de estos parámetros sobre las características estructurales de las SUVs obtenidas. Para realizar estos experimentos se utilizó la configuración experimental y los procedimientos de operación descritos en el Apartado 2.2. En la Tabla 3.5 se encuentran descritos los parámetros de operación y las características estructurales de los sistemas vesiculares obtenidos.

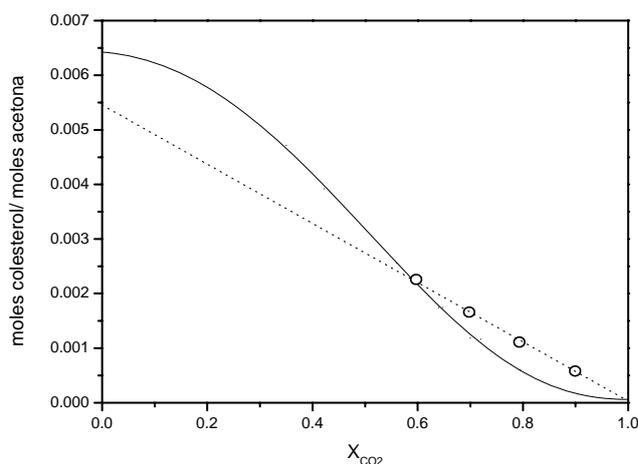
**Tabla 3.5.** Influencia de los parámetros de operación del proceso DELOS-SUSP sobre las características estructurales del sistema vesicular “colesterol/CTAB”.

| Experimento | CTAB/col <sup>a</sup><br>(mol/mol) | $X_{CO_2}$ | $\beta_i$ | $\Delta T^b$<br>(°C) | Rendimiento <sup>c</sup> | Tamaño                      |                  | Estabilidad       |
|-------------|------------------------------------|------------|-----------|----------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------|-------------------|
|             |                                    |            |           |                      |                          | D(0,5) <sup>d</sup><br>(nm) | I.U <sup>e</sup> | $\zeta^f$<br>(mV) |
| NS96        | 50/50                              | 0,6        | 0,8       | -54                  | 94                       | 167                         | 3,4              | +88,8             |
| NS94        | 50/50                              | 0,7        | 0,8       | -73                  | 75                       | 151                         | 3,9              | +91,1             |
| NS93        | 50/50                              | 0,8        | 0,8       | -74                  | 78                       | 134                         | 14,8             | +92,3             |
| NS92        | 50/50                              | 0,9        | 0,8       | -88                  | 61                       | 125                         | 2,9              | +101,1            |
| NS91        | 50/50                              | 0,6        | 0,6       | -62                  | 94                       | 229                         | 3,9              | +76,6             |
| NS81        | 50/50                              | 0,6        | 0,7       | -56                  | 84                       | 129                         | 12,8             | +74,4             |
| NS83        | 50/50                              | 0,6        | 0,9       | -55                  | 93                       | 125                         | 3,4              | +92,3             |
| NS82        | 50/50                              | 0,6        | 1,1       | -58                  | 73                       | 104                         | 19,8             | +84,1             |

[a] Relación molar CTAB/colesterol. [b] Descenso de temperatura medido durante la despresurización. [c] Rendimiento del proceso. [d] Diámetro medio de partícula en volumen. [e] Índice de uniformidad de la muestra (%). [f] Estabilidad de la muestra definida por el potencial zeta [g] Condiciones de operación: Pw=10MPa, Tw=308K, concentración de CTAB=1% en volumen.

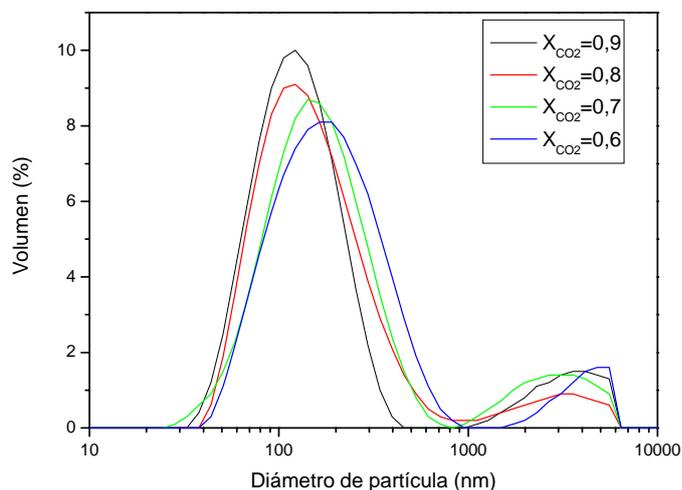
### 3.4.1 Influencia de la fracción molar de dióxido de carbono

Para estudiar la influencia de la fracción molar de  $CO_2$ ,  $X_{CO_2}$  sobre las características estructurales del sistema vesicular CTAB/colesterol obtenido por DELOS-SUSP, se realizaron varios experimentos en los que se despresurizaron disoluciones de colesterol en acetona (160mL) expandidas con  $CO_2$ , preparadas a diferentes fracciones molares de dióxido de carbono,  $X_{CO_2}$ , sobre un volumen de 1500mL de una disolución acuosa con un 1% (v) de CTAB (ver Figura 3.22).



**Figura 3.22.** Curva de solubilidad del colesterol en mezclas “acetona/ $CO_2$ ” a P=10Ma y T= 308K (—). Variación de la solubilidad según un proceso de disolución ideal a  $\beta_i=0,8$  (---). Puntos ( $X_{CO_2}$ , C) de las disoluciones expandidas de los experimentos NS92, NS93, NS94 y NS96 (O).

Tal y como muestran los resultados de los experimentos NS96, NS94, NS93 y NS92 descritos en la Tabla 3.5, a mayor contenido de CO<sub>2</sub> en la disolución expandida menor es el tamaño medio de las vesículas (ver Figura 3.23) y mayor es el valor de potencial zeta de las mismas, superior a +90mV, que garantiza una gran estabilidad sistema.



**Figura 3.23.** Curvas de distribución de tamaños de partícula medidas por DLS de los sistemas “colesterol/CTAB” obtenidos en los experimentos NS96, NS94, NS93 y NS92.

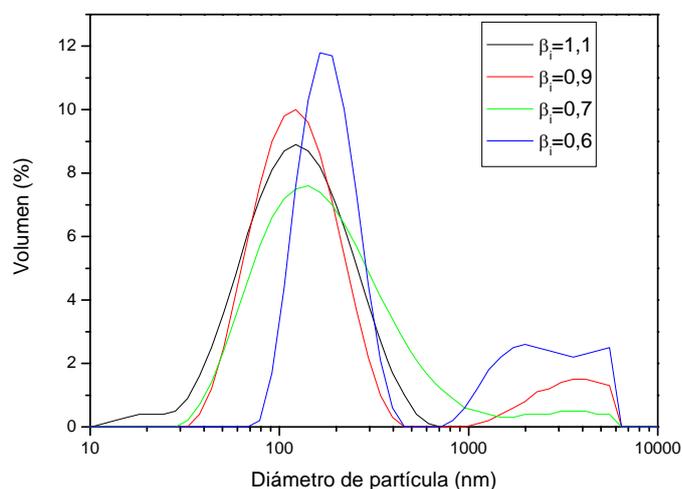
Como se puede observar en la Tabla 3.5, a mayor contenido de CO<sub>2</sub> en la disolución expandida, más grande es el descenso de temperatura experimentado por la disolución de colesterol durante la etapa de despresurización. Este descenso de temperatura se produce por la evaporación del CO<sub>2</sub> durante la despresurización de la disolución expandida con CO<sub>2</sub>. Como la evaporación del CO<sub>2</sub> tiene lugar en la misma extensión en cualquier punto de la disolución líquida expandida, el descenso de temperatura experimentado por la disolución despresurizada es extremadamente homogéneo. Los elevados valores del descenso de temperatura alcanzados cuando X<sub>CO<sub>2</sub></sub> se incrementa podrían explicar parcialmente el descenso en el diámetro medio de las vesículas observado, ya que esto podría favorecer la formación de un gran número de precursores de las vesículas. Sin embargo, el diferente contenido en CO<sub>2</sub> de la disolución expandida también podría influir en la eficiencia del sistema de mezclado entre la disolución despresurizada de colesterol y la disolución acuosa del tensoactivo, donde el proceso de formación de la vesícula se completa, siendo también parcialmente responsable de la disminución en el tamaño medio de las SUVs observado.

### 3.4.2 Influencia de la sobresaturación inicial del colesterol

Para estudiar la influencia de la sobresaturación inicial del lípido disuelto en la fase orgánica sobre las características estructurales del sistema vesicular CTAB/colesterol obtenido por DELOS-SUSP, se realizaron una serie de experimentos en los que se despresurizaron disoluciones de colesterol en acetona (160mL) expandidas con CO<sub>2</sub> preparadas con diferentes valores iniciales de  $\beta_i$ , sobre un volumen de 1500mL con un 1% (v) de CTAB.

Tal y como muestran los resultados de la Tabla 3.5, conforme disminuye la sobresaturación inicial desde un valor de  $\beta_i=1,1$  (NS82) a  $\beta_i=0,6$  (NS91), el tamaño medio de las vesículas aumenta de 104 a 229nm (Figura 3.24), y a su vez disminuye el rendimiento del proceso. Respecto al valor del potencial zeta, no se ha observado un cambio significativo con la variación de  $\beta_i$ .

Esta reducción del tamaño de la fase dispersa observada conforme se incrementa progresivamente la sobresaturación inicial,  $\beta_i$ , manteniendo constante el resto de parámetros, podría ser consecuencia directa del incremento de la sobresaturación máxima alcanzada durante la etapa de despresurización, la cual provocaría un incremento en la velocidad de producción de los precursores de las vesículas.

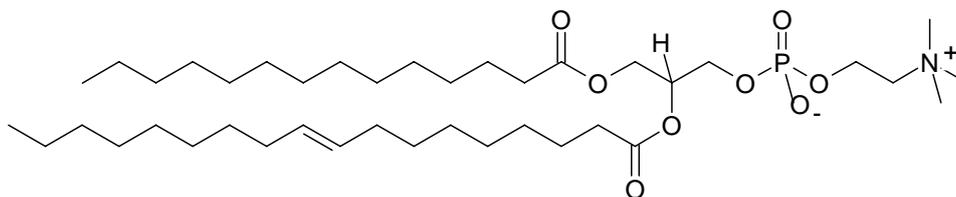


**Figura 3.24.** Curvas de distribución de tamaños de partícula medidas por DLS de los sistemas “CTAB/colesterol” obtenidos en los experimentos NS82, NS83, NS81 y NS91.

### 3.5 Preparación de otros sistemas vesiculares por DELOS-SUSP

#### 3.5.1 Preparación de sistemas vesiculares de fosfatidilcolina por DELOS-SUSP

La fosfatidilcolina, conocida también como lecitina, es el fosfolípido más utilizado en la preparación de vesículas para uso farmacéutico y cosmético, que en este caso denominan liposomas. La fosfatidilcolina está formada por dos ácidos grasos de cadena larga unidos a un grupo glicerol, y éste a un grupo fosfato con una colina (ver Figura 3.25). Comercialmente se pueden encontrar lecitinas de origen animal y vegetal, así como de naturaleza sintética. La fosfatidilcolina, debido a su naturaleza no-polar, es soluble en varios disolventes orgánicos, tales como cloroformo, hexano, metanol y etanol, e insoluble en agua, acetona fría y dióxido de carbono puro. Asimismo, requiere condiciones especiales de almacenamiento como bajas temperaturas,  $-20^{\circ}\text{C}$ , y tiene una vida media de 6 meses.



**Figura 3.25.** Representación de la estructura química de la fosfatidilcolina.

En el presente trabajo se ha estudiado la viabilidad del proceso DELOS-SUSP para la preparación de sistemas vesiculares de fosfatidilcolina. Para ello se comprobó que la fosfatidilcolina cumplía los requisitos necesarios para poder ser procesada mediante el método DELOS-SUSP, como ser insoluble en agua y soluble en alguna mezcla de un disolvente convencional y  $\text{CO}_2$ , a unas condiciones de presión y de temperatura de trabajo determinadas. El sistema utilizado para llevar a cabo este estudio fue el formado por la fosfatidilcolina, etanol y  $\text{CO}_2$ . Este sistema se caracteriza por el hecho de que el  $\text{CO}_2$  actúa como cosolvente en un rango bastante amplio de concentraciones,  $0 < X_{\text{CO}_2} < 0,8$ , cuando se emplea una sobresaturación inicial de  $\beta_i = 1$ . En base al comportamiento de solubilidad de la fosfatidilcolina en mezclas “etanol/ $\text{CO}_2$ ”, y mediante la configuración experimental y los procedimientos de operación descritos en el Apartado 2.2, se llevó a cabo la preparación de un sistema vesicular de

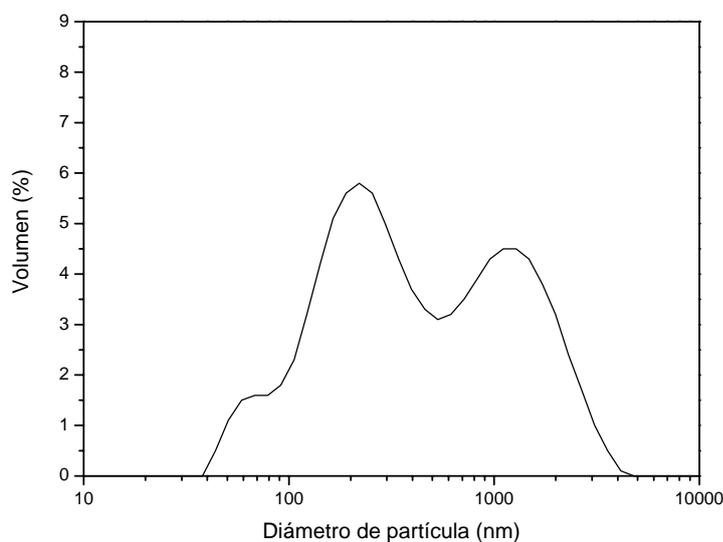
fosfatidilcolina en una fase acuosa mediante el método DELOS-SUSP. En dicho experimento, se empleó una disolución de fosfatidilcolina en etanol (6mL) expandida con CO<sub>2</sub>, que se despresurizó sobre 26mL de una solución tampón de PBS. En la Tabla 3.6 están recogidos los parámetros de operación y las características estructurales de la dispersión de fosfatidilcolina obtenida.

**Tabla 3.6.** Experimentos para la obtención de sistemas dispersos de fosfatidilcolina mediante el método de Bangham y el proceso DELOS-SUSP.

| Experimento | Proceso              | X <sub>CO2</sub> | ΔT <sup>a</sup><br>(°C) | Rendimiento <sup>b</sup><br>(%) | Tamaño                      |                   | Estabilidad         |                                       |
|-------------|----------------------|------------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------|---------------------|---------------------------------------|
|             |                      |                  |                         |                                 | D(0,5) <sup>c</sup><br>(nm) | I.U. <sup>d</sup> | ζ <sup>e</sup> (mV) | V <sub>s</sub> <sup>f</sup><br>(μm/s) |
| NS136       | Bangham <sup>g</sup> | 0                | 0                       | 100                             | 246                         | 4.7               | -9,3                | 0,15                                  |
| NS131       | DS <sup>h</sup>      | 0,92             | -65                     | 96                              | 278                         | 7.8               | -8,1                | 0,16                                  |

[a] Descenso de temperatura medido durante la despresurización. [b] Rendimiento del proceso en %. [c] Diámetro medio de partícula en volumen. [d] Índice de uniformidad de la muestra (%). [e] Potencial zeta. [f] Velocidad de sedimentación. [g] Dispersión obtenida por el método Bangham a presión atmosférica, T<sub>w</sub>=308K, y β<sub>i</sub>=1. [h] Dispersión obtenida por DELOS-SUSP a P<sub>w</sub>=10MPa, T<sub>w</sub>=308K, β<sub>i</sub>=1.[i] Condiciones de operación: Volumen fase acuosa=26mL, Volumen disolución orgánica=6mL.

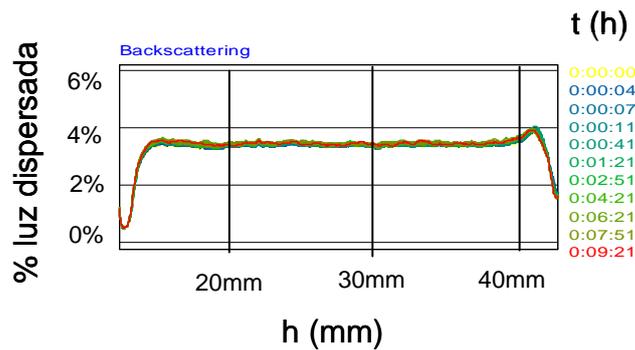
Tal y como se puede observar en la Tabla 3.6, se obtuvo un sistema vesicular de fosfatidilcolina con un diámetro medio de partícula centrado en 278nm (Figura 3.26), y con un valor de potencial zeta igual a -8,1mV, que sugiere una baja estabilidad del sistema obtenido.



**Figura 3.26.** Curva de distribución de tamaños de partícula medida por DLS del sistema vesicular de fosfatidilcolina en fase acuosa obtenidos por DELOS-SUSP.

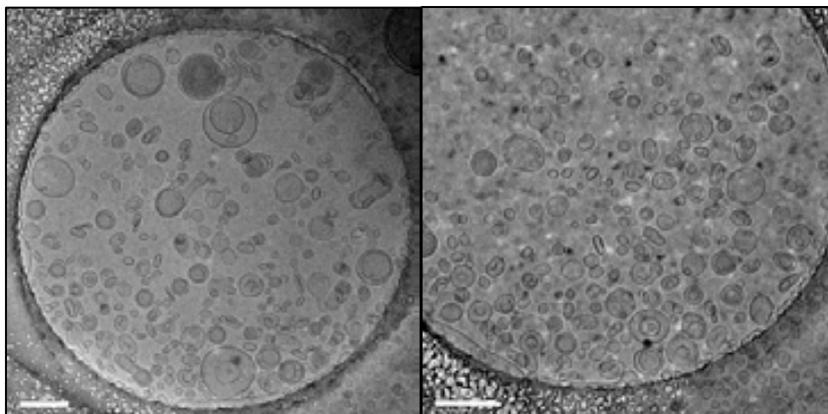
La estabilidad del sistema vesicular de fosfatidilcolina obtenido por DELOS-SUSP también se estudió con un analizador óptico de estabilidad de dispersiones

líquidas, tal y como se describe en la Parte Experimental. Tal y como se puede observar en la Figura 3.27, los perfiles de dispersión de luz obtenidos para ese sistema se mantienen constantes a lo largo de todo el tiempo de barrido, quedándose prácticamente todos solapados. A partir de dichos perfiles se ha calculado la cinética de sedimentación de las vesículas, obteniéndose una velocidad de sedimentación entorno a  $0,16 \mu\text{m/s}$ . Esta estabilidad contrasta con el pequeño valor del potencial zeta que indica una estabilidad inferior. Por el momento no se dispone una explicación lógica de estos resultados.



**Figura 3.27.** Variación con el tiempo del % de luz dispersada a distintas alturas (h) del vial que contiene el sistema vesicular de fosfatidilcolina obtenido por DELOS-SUSP

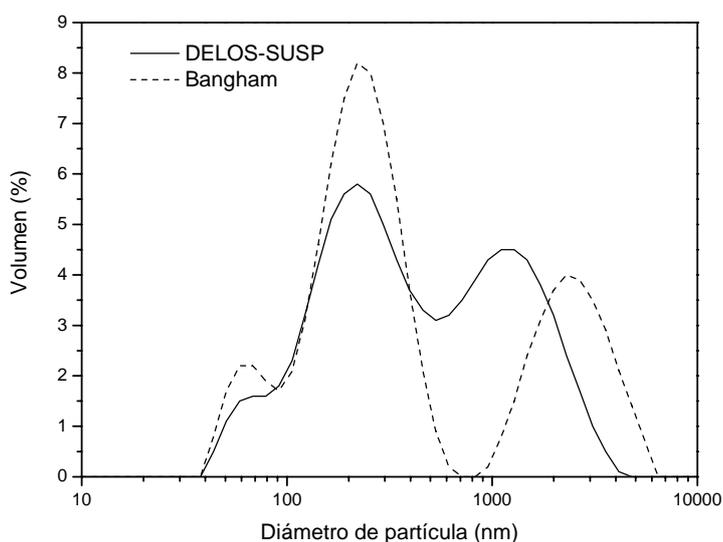
La morfología del sistema vesicular también se estudió mediante la técnica de crio-TEM. En las imágenes de crio-TEM de la Figura 3.28, se puede observar que el sistema tiene una microestructura de tipo vesicular formada, en su mayoría, por una única bicapa lipídica. Es de destacar que en este caso las vesículas no tenían el mismo grado de homogeneidad que cuando se emplea CTAB y colesterol.



**Figura 3.28.** Imágenes de crio-TEM del sistema vesicular de fosfatidilcolina en fase acuosa preparado por DELOS-SUSP.

La eficiencia del método DELOS-SUSP para la preparación de liposomas de fosfatidilcolina se comparó con la de la metodología convencional desarrollada por Bhangam.<sup>(22)</sup> Como ya se comentó al principio del Capítulo, esta metodología se basa en la disolución del fosfolípido en un disolvente orgánico, seguido de la eliminación del disolvente orgánico, mediante evaporación, para formar una película del lípido en las paredes del recipiente. Las vesículas se forman al hidratar la película seca de lípido con una fase acuosa por agitación, para pasar posteriormente a un tratamiento de post formación con ultrasonificación, hasta conseguir una reducción del tamaño de los liposomas.

Así, empleando el método de Bangham, se preparó un sistema vesicular de fosfatidilcolina en una fase acuosa y se comparó con el obtenido por DELOS-SUSP. En dicho experimento, la fosfatidilcolina fue disuelta en 6 mL de etanol en un matraz. Después, se evaporó el disolvente orgánico a vacío en un rotavapor, para crear una película de lípido sobre las paredes del recipiente. Seguidamente, se adicionó 27 mL de una solución tampón salina de PBS para hidratar dicha película y formar los liposomas. Por último, la suspensión formada fue sumergida en un baño termostatizado y se la sometió a ultrasonidos a 25°C durante 10 minutos hasta obtener un sistema vesicular homogéneo. Los parámetros de operación y características estructurales de dicho sistema se describen en la Tabla 3.6.

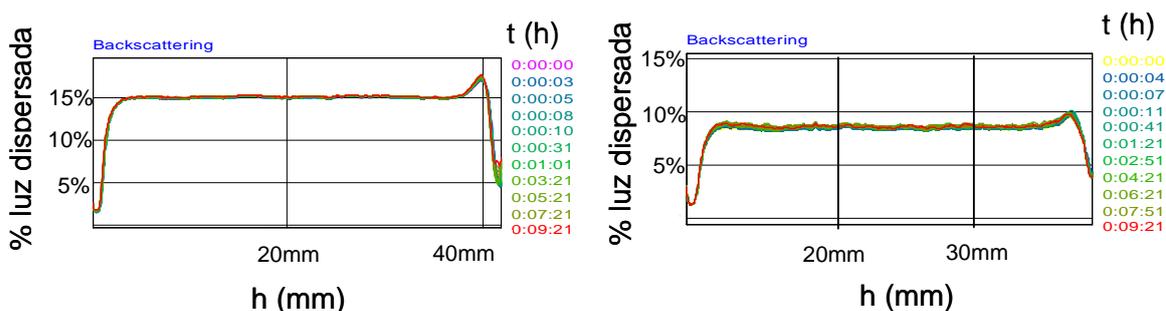


**Figura 3.29.** Curvas de distribución de tamaños de partícula medidas por DLS de los sistemas vesiculares de fosfatidilcolina en fase acuosa obtenidos por DELOS-SUSP y por el método Bangham.

Si comparamos los experimentos NS136 y NS13, se puede observar que los liposomas obtenidos por ambas metodologías presentan distribuciones de tamaños de partícula y estabilidades muy similares. En la Figura 3.29 se muestran las curvas de

distribución de tamaño de partícula de ambos experimentos. En ella se puede observar que las dos curvas de tamaños son bimodales, con dos poblaciones de partículas de tamaños bastante diferentes y un diámetro medio de tamaño de partícula centrado entorno a 250-275nm.

La estabilidad de éste sistema vesicular preparado por el método convencional también se estudio con un analizador óptico de estabilidades, observándose que sus perfiles de dispersión de luz se mantienen constantes a lo largo de todo el tiempo de barrido, quedando prácticamente todos solapados entre sí, de forma análoga a lo que se observó en el sistema vesicular preparado por DELOS-SUSP (Figura 3.30). Asimismo, el estudio de su cinética de sedimentación reveló una velocidad de sedimentación de 0,16  $\mu\text{m/s}$ , prácticamente idéntica a la obtenida para los liposomas preparados por DELOS-SUSP.

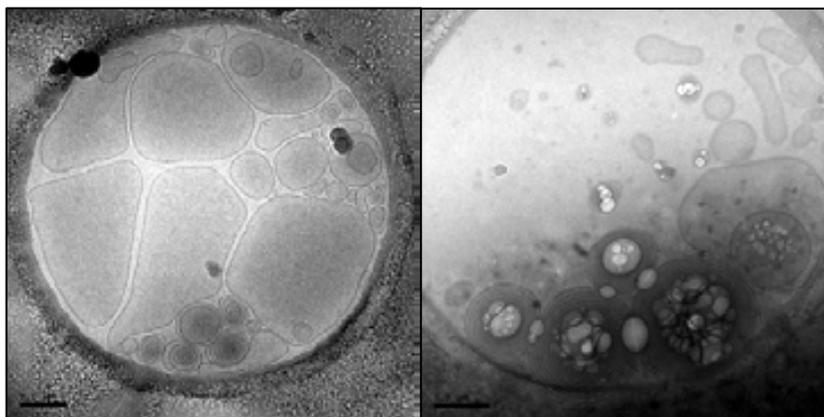


**Figura 3.30.** Variación con el tiempo del % de luz dispersada a distintas alturas (h) del vial que contiene el sistema vesicular de fosfatidilcolina obtenido mediante el proceso Bangham (izquierda) y el DELOS-SUSP (derecha).

Respecto a la morfología de los sistemas vesiculares, las imágenes de crio-TEM revelan que están formados por vesículas esféricas multicapa con un ordenamiento interno parecido al de una cebolla (Figura 3.31 derecha). Asimismo, en esta muestra también se puede observar la presencia de unas estructuras de forma irregular de tamaño por encima de la micra, probablemente debidas a la fusión de varios liposomas (Figura 3.31 izquierda).

Como resumen, se puede afirmar que la preparación de sistemas vesiculares de fosfatidilcolina mediante el proceso DELOS-SUSP, permite la obtención de sistemas vesiculares con un diámetro medio de partícula y estabilidades, muy similares a los liposomas obtenidos por el método convencional de Bangham. Respecto a la

morfología, se observa que las vesículas preparadas por DELOS-SUSP presentan una mayor uniformidad en su morfología que aquellas preparadas por la metodología convencional, lo cual puede tener importantes implicaciones en las diferentes aplicaciones farmacológicas de este tipo de sistemas.



**Figura 3.31.** Imágenes de crio-TEM del sistema vesicular de fosfatidilcolina en fase acuosa preparado por el método Bangham.

### **3.5.2 Influencia de los parámetros de operación del proceso DELOS-SUSP sobre las características estructurales de los sistemas vesiculares de fosfatidilcolina.**

También se decidió analizar, en este caso, la influencia de la variación de los parámetros operacionales del proceso DELOS-SUSP sobre las características estructurales de los sistemas vesiculares preparados con fosfatidilcolina. Para ello se realizaron una serie de experimentos utilizando el sistema “fosfatidilcolina/etanol/CO<sub>2</sub>/agua”, en los que se varió de manera sistemática tanto la fracción molar de CO<sub>2</sub>, como la sobresaturación de la disolución inicial  $\beta_i$  y la relación de concentración entre las fosfatidilcolina y el medio dispersante. Para realizar estos experimentos se utilizó la configuración experimental y los procedimientos de operación descritos en el Apartado 2.2. En la Tabla 3.7 se encuentran descritos los parámetros de operación y las características estructurales de los sistemas vesiculares obtenidos.

**Tabla 3.7.** Influencia de los parámetros de operación del proceso DELOS-SUSP sobre las características estructurales del sistema vesicular de fosfatidilcolina.

| Experimento | Parámetro variable | $X_{CO_2}$ | $\beta_i$ | $[Lípido]_w^a$<br>(g/mL) | Tamaño                       |                  | Estabilidad       |                                |         |
|-------------|--------------------|------------|-----------|--------------------------|------------------------------|------------------|-------------------|--------------------------------|---------|
|             |                    |            |           |                          | D(0,5 <sup>b</sup> )<br>(nm) | I.U <sup>c</sup> | $\zeta^d$<br>(mV) | $V_s^e$<br>( $\mu\text{m/s}$ ) | Estable |
| NS111       | $X_{CO_2}$         | 0,65       | 1,5       | 0,01                     | 763                          | 9,1              | -1,2              | 3,22                           | No      |
| NS135       | $X_{CO_2}$         | 0,81       | 1,5       | 0,01                     | -                            | -                | -                 | 1,48                           | No      |
| NS131       | $X_{CO_2}$         | 0,92       | 1,5       | 0,01                     | 278                          | 7,8              | -8,1              | 0,16                           | Si      |
| NS127       | $\beta_i$          | 0,92       | 1         | 0,01                     | 2810                         | 6,3              | -7,5              | 18,88                          | No      |
| NS132       | $\beta_i$          | 0,92       | 2         | 0,01                     | 276                          | 3,5              | -8,1              | 0,14                           | Si      |
| NS129       | [Lípido]           | 0,92       | 1,5       | 0,007                    | 190                          | 5,6              | -3,14             | 0,11                           | Si      |
| NS125       | [Lípido]           | 0,92       | 1,5       | 0,035                    | 375                          | 4,2              | -10,1             | 0,30                           | Si      |

[a] Concentración del lípido en la fase acuosa (g/mL) [b] Diámetro medio de partícula en volumen. [c] Índice de uniformidad de la muestra (%). [d] Estabilidad de la muestra definida por el potencial zeta [e] Velocidad de sedimentación. [f] Dispersiones obtenidas mediante el proceso DELOS-SUSP a  $P_w=10\text{MPa}$ ,  $T_w=308\text{K}$  [h] Condiciones de operación: Volumen fase acuosa=26mL, Volumen disolución orgánica=6mL. [i] Rendimiento del proceso en todos los casos está por encima del 96% en peso.

### 3.5.2.1 Influencia de la fracción molar de dióxido de carbono

Para estudiar la influencia de la fracción molar de  $CO_2$  sobre las características estructurales de los sistemas vesiculares de FC obtenidos por DELOS-SUSP, se realizaron varios experimentos en los que se despresurizaron disoluciones de fosfatidilcolina en etanol (6mL), expandidas con  $CO_2$  preparadas con diferentes fracciones molares de  $CO_2$ , sobre un volumen de 26mL de una solución tampón de PBS en agua.

Tal y como muestran los resultados de la Tabla 3.8, se observa que a un mayor contenido de  $CO_2$  en la disolución expandida, menor es el tamaño medio de los liposomas, mayor el valor del potencial zeta y a su vez es menor la velocidad de sedimentación de los liposomas.

Esta reducción del tamaño de los liposomas observada conforme se incrementa progresivamente la fracción molar de  $CO_2$ , de 0,65 (experimento NS111) a 0,92 (experimento NS131), podría ser consecuencia directa de que a un mayor contenido de  $CO_2$  en la disolución expandida, más acusado es el descenso de temperatura experimentado por el resto de la disolución, lo que causaría un incremento más grande y rápido de la sobresaturación, con lo que se alcanza una mayor sobresaturación.

Como consecuencia directa todo ello, el fenómeno de nucleación de los precursores de los liposomas se verá más favorecido que el fenómeno de crecimiento de

aquellos, con lo que se podrían organizar adecuadamente dando lugar a liposomas con distribuciones de tamaño más pequeñas y de mayor estabilidad. En todos estos experimentos, los rendimientos del proceso DELOS-SUSP fueron muy elevados, entorno al 96% en peso, lo que probablemente sea debido al amplio rango de cosolvencia que presenta el CO<sub>2</sub> sobre las disoluciones expandidas de fosfatidilcolina en etanol.

### 3.5.2.2 Influencia de la sobresaturación inicial del soluto

Para estudiar la influencia de la sobresaturación inicial sobre las características estructurales de los sistemas vesiculares de fosfatidilcolina obtenidos por DELOS-SUSP, se realizaron varios experimentos en los que se despresurizaron disoluciones de fosfatidilcolina en etanol (6mL) expandidas con CO<sub>2</sub> preparadas a diferentes  $\beta_i$ , sobre un volumen de 26mL de una solución tampón de PBS en agua.

Tal y como muestran los resultados descritos en la Tabla 3.7, se observa que conforme disminuye la sobresaturación inicial desde un valor de  $\beta_i=2$  (NS132) a  $\beta_i=1$  (NS127), el tamaño medio de los liposomas aumenta de 276 a 2810nm. Respecto al valor del potencial zeta, no se observa un cambio significativo con la variación de  $\beta_i$ . Sin embargo, es destacable el gran incremento observado en la velocidad de sedimentación de los liposomas obtenidos, que va de un valor de 0,14  $\mu\text{m/s}$  para  $\beta_i=2$  a 18.88  $\mu\text{m/s}$ , para  $\beta_i=1$ .

Esta reducción del tamaño de los liposomas observada conforme se incrementa la sobresaturación inicial, se puede explicar a través de la relación directa entre la sobresaturación inicial,  $\beta_i$ , y la máxima alcanzada,  $\beta_{\text{max}}$ , en el proceso, ya que a menos sobresaturación inicial, más bajo será el grado de sobresaturación máximo alcanzado. Por tanto, mayor será el tamaño medio de partícula, y en consecuencia los liposomas serán más inestables en el medio acuoso, aumentando su velocidad de sedimentación.

### 3.5.2.3 Influencia de la relación entre la fosfatidilcolina y el medio dispersante

Para estudiar la influencia de la relación de concentraciones entre la fosfatidilcolina y el medio dispersante sobre las características estructurales de los sistemas vesiculares obtenidos por DELOS-SUSP, se realizaron varios experimentos en los que se despresurizaron disoluciones de fosfatidilcolina en etanol (6mL) expandidas

con CO<sub>2</sub> sobre diferentes volúmenes de la solución acuosa con un tampón salino de PBS (6, 26, y 30 mL).

Tal y como se muestra en la Tabla 3.7, se observa que conforme aumenta la concentración de fosfatidilcolina en el medio acuoso, desde un valor de 0,007g/mL (NS129) a 0,035g/mL (NS125), el tamaño medio de los liposomas aumenta de 190 a 375nm, mientras que los valores del potencial zeta y las velocidades de sedimentación de los liposomas, no se ven afectados.

Este incremento del tamaño de los liposomas observado conforme se aumenta progresivamente la concentración de lípido en el medio acuoso, podría ser una consecuencia directa de que a mayor contenido de fosfatidilcolina en el medio, mayor será el número de liposomas formados, y por tanto, mayor probabilidad de que se produzcan fusiones entre los liposomas, lo que favorecería los fenómenos de desestabilización.

### **3.6 Conclusiones**

- ☒ Se ha estudiado el autoensamblaje entre moléculas de CTAB y colesterol en un medio acuoso en función de su composición y se ha propuesto un posible mecanismo para explicar la transición de micelas a vesículas en dicho sistema, en el cual se ha observado la formación de micelas mixtas como fase intermedia.
- ☒ El método DELOS-SUSP permite obtener en una sola etapa “small unilamellar vesicles” (SUVs) de colesterol y CTAB, no alcanzables por mezclado convencional.
- ☒ Los parámetros de operación más importantes que gobiernan el tamaño de la fase dispersa en un proceso DELOS-SUSP, son el contenido en CO<sub>2</sub> de la disolución expandida, la sobresaturación inicial del soluto y las relaciones de concentración entre soluto/tensoactivo y soluto/fase dispersante.

### 3.7 Referencias

- (1) (a) Christensen, S.M.; Stamou, D. *Soft Matter*, **2007**, *3*, 828. (b) Bolinger, P.-Y.; Stamou, D.; Vogel, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8594. (c) Bolinger, P.-Y.; Stamou, D.; Vogel, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5544.
- (2) (a) Torchilin, V.P. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 145. (b). Bellomo, E.B; Wyrsta, M.D.; Pakstis, L.; Pochan, D.J.; Deming, T.J. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 244. (c) Möhwald, H. *Soft Matter*, **2005**, *1*, 328. (b) Holyst, R *Soft Matter* **2005**, *1*, 329.
- (3) Lasic, D.; Barenholz, Y.; Eds. *Handbook of nonmedical applications of liposomes: From gene delivery and diagnostics to ecology*; CRC Press: Boca Raton, FL, **1996**.
- (4) (a) Small, D.M., *The Physical Chemistry of Lipids* **1986**, Plenum Press, New York; (b) Uchegbu, F.I., *Synthetic surfactant vesicles*, **2000**, Harwood academia publishers, UK.
- (5) Chopineau, J., Carion-Travella, B., Lesieur, S., Ollivon, M., *Biochimie* **1998**, in press.
- (6) (a) Cuomo, F.; Lope, F.; Angelico, Ruggero; Colafemmina, G.; Ceglie, A., *Colloids Surf., B* **2008**, *64*, 184. (b) Meure, L.A.; Knott, R.; Foster, N.R. ; Dehghani, F. *Langmuir* **2009**, *25*, 326; (c) Allen, T.M.; Moase, E.H.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, *21*, 2/(2), 117. (d) Ostro, M.J., *Liposomes from biophysics to therapeutics*; Marcel Dekker, INC., New Jersey, **1983**, p.109-111.
- (7) Goni, F.M., Urbaneja, M.A., Alonso, A., *Liposome Technology* **1993**, CRC Press, London Tokyo, 261-273.
- (8) Bangham, A.D., Horne, R.W, *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 660,
- (9) Ciobanu, M.; Heurtault, B.; Schultz, P.; Ruhlmann, C.; Muller, C.D.; Frisch, B., *Int. J. Pharm.* **2007**, *344*, 154.
- (10) Sulkowski, W.W.; Pentak, D.; Nowak, K.; Sulkowska, A., *J. Mol. Struct.* **2005**, *744*, 737.
- (11) Socaciu, C.; Jessel, R.; Dile, H.A., *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *106*, 79.
- (12) Engberts, J.B.F.N., Hoekstra, D., *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1241*, 323.
- (13) Cate, M.J.ten; Crego-Calama, M.; Reinhoudt, D.N., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10840,

- (14)Liu, T. Guo, R., *Colloid Polym. Sci.* **2007**, 285, 711.
- (15)Biju, S.S.; Talegaonkar, S.; Mishra, P.R.; Khar, R.K., *Indian J. Pharm. Sci.* **2006**, 68, 2, 141.
- (16)(a) Liu, T. Guo, R., *Langmuir*, 2005, 11034. (b) Florence, A.T.; Arunothayanun, P.; Kiri, S.; Bernard, M-S, Uchegbu, I.F., *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 1995.
- (17)(a) Manosroi, A.; Wongtrakul, P.; Manosroi, J.; Sakai, H.; Sugawara, F.; Yuasa, M.; Abe, M., *Colloids Surf., B* **2003**, 30, 129. (b) Manosroi, A.; Thathang, K.; Werner, R.G.; Schubert, R.; Manosroi, J., *Int. J. Pharm.* **2008**, 356, 291.
- (18)<http://www.avantilipids.com/TransfectionReagents.html>.
- (19)(a) Wiesman, Z.; Dom, N.B.; Sharvit, E.; Grinberg, S.; Linder, C.; Heldman, E.; Zaccai, M., *J. Biotechnol.* **2007**, 130, 85. (b) Lv, H; Zhang, S.; Wang, B.; Cui, S.; Yan, J., *J. Controlled Release* **2006**, 114, 100,
- (20)(a) Barreleiro, P.C.A.; Lindman, B., *J. Phys. Chem B* **2003**, 107, 6208. (b) Pinnaduwege, P.; Schmitt, L.; Huang, L., *Biochim. Biophys. Acta.* **1989**, 985, 33.
- (21)R.C.C. Liposomes: A practical approach, Oxford University Press, New York, **1990**, p. 33–104.
- (22)Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Watkins, J.C. *J. Mol. Biol.* **1965**, 13, 238.
- (23)Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Weissmann, G. *J. Mol. Biol.* **1965**, 13, 253.
- (24)(a) Danilo D. Lasic, *Liposomes in gene delivery*, **1997**, CRC Press, Boca Raton, FL. (b) Marc J. Ostro, *Liposomes from biophysics to therapeutics* **1987**, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel. (c) Delattre, J., Couvreur, P., Puisieux, F., Philippot, J.R., Schuber, F., Les Liposomes : aspects technologies, biologiques and pharmaceutiques **1993**, Les editions INSERM, Paris.
- (25)Lasch, J.; Weissig, V.; Brandl, M. Preparation of liposomes. In Torchilin, V. and Weissig V. (eds.), *Liposomes: A practical approach*, Oxford University Press, New York **2003**, 3–29.
- (26)Brunner, J.; Skrabal, P.; Hauser, H. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, 455, 322.

- (27)Batzri, S.; Korn, E.D. *Biochim. Biophys. Acta.* **1973**, 298, 1015.
- (28)Deamer, D.; Bangham, A.D. *Biochim. Biophys. Acta.* **1976**, 443, 629.
- (29)Deamer, D.W. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1978**, 308, 250,
- (30)Szoka, F. Jr.; Papahadjopoulos, D. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1978**, 75, 4194.
- (31)Froekjaer, S. *Liposomes: A practical approach*, Oxford University Press, New York **1990**, 68–70,
- (32)Kim, S.; Martin, G.M. *Biochim. Biophys. Acta.* **1981**, 646, 1.
- (33)Li, C.; Deng, Y. *J. Pharm. Sci.* **2004**, 93, 1403.
- (34)Jahn, A.; Vreeland, W. N.; DeVoe, D. L.; Locascio, L. E.; Gaitan, M. *Langmuir* **2007**, 23, 6289.
- (35)Meure, L.A.; Foster, N.R.; Dehghani, F. *AAPS PharmSciTech* **2008**, 9, 798.
- (36)Anton, K.; Hoogevest, P. Van; Frederiksen, L. Preparation of a liposome dispersion containing an active agent by compression-decompression, EP616801, **1994**.
- (37)Otake, K.; Imura, T.; Sakai, H.; Abe, M. *Langmuir* **2001**, 17, 3898.
- (38)Castor, T.P. Methods and apparatus for liposomes preparation, WO9427581, **1994**.
- (39)Castor, T.P.; Chu, L. Methods and apparatus for making liposomes containing hydrophobic drugs. US5776486, **1998**.
- (40)T. P. Castor. *Curr. Drug Delivery.* **2005**, 2, 329
- (41)L. Frederiksen, L.; Anton, K.; van Hoogevest, P.; Keller, H. R.; Leuenberger, H. J. *Pharm. Sci.* **1997**, 86, 921.
- (42)Otake, K.; Shimomura, T.; Goto, T.; Imura, T.; Furuya, T.; Yoda, S.; Takebayashi, Y.; Sakai, H.; M. Abe, M. *Langmuir* **2006**, 22, 2543.
- (43)Magnan, C.; Badens, E.; Commenges, N.; Charbit, G.; *J. Supercrit. Fluids* **2000**, 19, 69.
- (44)Badens, E.; Magnan, C. Charbit, G. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 72, 194.
- (45)Kunastitchai, S.; Pichert, L.; Sarisuta, N.; Muller, B.W. *Int. J. Pharm.* **2006**, 316, 93.
- (46)Meure, L.A.; Robert, K.; Foster, N.R.; Dehghani, F. *Langmuir* **2009**, 25, 326.

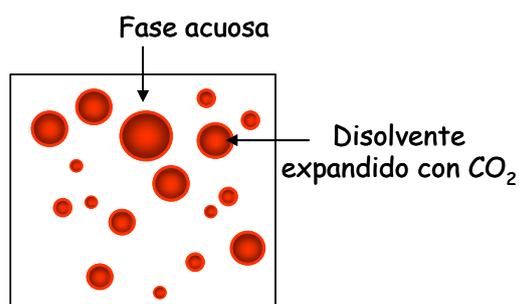
- (47) Cano-Sarabia, M.; Ventosa, N.; Sala, S.; Patiño, C.; Arranz, R.; Veciana, J. *Langmuir* **2008**, *24*, 6, 2433.
- (48) D. Horn, J. Rieger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 4330,
- (49)(a) Ollivon, M.; Lesieur, S.; Gabrielle-Madelmont, C.; Paternostre, M.; *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1508*, 34. (b) Stuart, M.C.A.; Boekema, E.J. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 2681. (c) Dahim, M.; Pansu, R.; Roncin, J.; Ollivon, M. *S.T.P. Pharma Sci.* **1999**, *9*, 509.
- (50)(a) Seras, M.; Edwards, K.; Almgren, M.; Carlson, G.; Ollivon, M.; S. Lesieur, S. *Langmuir* **1996**, *12*, 30, (b) Seras, M.; Gallay, J.; Vincent, M.; Ollivon, M.; Lesieur, S. *J. Colloid Interface Sci.* **1994**, *167*, 159.
- (51)(a) Barazzouk, S.; Lee, H.; Hotchandani, S.; Kamat, P.V *J. Phys. Chem* **2000**, *104*, 3616. (b) Zachariasse, K.A.; Van Phuc, N.; Kozankiewicz, B. *J. Phys. Chem* **1981**, *85*, 2676. (c) Drummond, C.J.; Grieser, F.; Healy, T.W. *Faraday Discuss Chem. Soc.* **1986**, *81*, 95. (d) Sarkar, M.; Poddar, S. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *221*, 181.
- (52)(a) Sabaté, R.; Gallardo, M.; De la Maza, A.; Estelrich, J. *Langmuir* **2001**, *17*, 6433. (b) Sabaté, R.; Gallardo, M.; Estelrich, J. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *233*, 205.
- (53) Klotz, I.M. *Chem. Rev.* **1947**, *41*, 373.
- (54) Angelova, A.; Fajolles, C.; Hocquelet, C.; Djedaini-Pilard, F.; Lesieur, S.; Bonnet, V.; Perly, B.; Lebas, G.; Mauclair, L. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *322*, 304.
- (55) Nagarajan, R. *Langmuir* **2002**, *18*, 31.
- (56)(a) Israelachvili, J.N *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press: New York, 1992; p 380-382. (b) Israelachvili, J.N.; Marcelja, S.; Horn, R.G.Q. *Rev. Biophys.* **1980**, *13*, 121.
- (57) Israelachvili, J.; Mitchell, D.J.; Ninham, B.W. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1976**, *72*, 1525.
- (58)(a) Hui, S.-W.; Sen, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5825. (b) Hui, S.-W. *Biophys. J.* **1993**, *65*, 1361.
- (59) Kumar, V.V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 444.

- (60) Zhao, F.; Du, Y-K.; Xu, J.K.; Liu, S.-F. *Colloid J.* **2006**, 68, 6, 784(b) Campanelli, A.R.; Scaramuzza, L *Acta Cryst.* **1986**, C42, 1380; (c) Li, W.; Han, Y-C.; Zhang, J-L.; Wang, L-X.; Song, *Colloid J.* **2006**, 68, 3, 304.
- (61) Kang, K-H.; Kim, H-U.; Lim, K-H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, 28, 4, 667
- (62) Angelova, B.; Ollivon, M.; Angelova, A. *Langmuir* **1999**, 15, 8225.
- (63) Lorin, A.; Flore, C.; Thomas, A.; Brasseur, R. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2004**, 8, 3, 163.

# Capítulo 4

## Preparación de micromulsiones “oil-in-water” (o/w) con disolventes expandidos con CO<sub>2</sub>

El objetivo principal de este capítulo es la búsqueda de sistemas “disolvente orgánico/agua/CO<sub>2</sub>” que puedan formar bajo ciertas condiciones de presión, temperatura y composición, microemulsiones de tipo aceite-en-agua (“oil-in-water”, o/w), en las cuales la fase apolar discontinua, “oil”, sea un disolvente orgánico expandido con CO<sub>2</sub>, y la fase continua, “water”, sea una fase rica en agua. El interés en la preparación de este tipo de emulsiones es su posible uso como plantillas para la obtención confinada de nanopartículas homogéneas en tamaño y forma. Como es bien conocido, la homogeneidad en los materiales particulados es un factor crucial en numerosos sectores industriales tales como el cosmético, el de los colorantes, tintes, y recubrimientos, así como para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas. Así por ejemplo, en el sector farmacéutico, el tamaño de partícula determina la vía de administración de un principio activo e influye enormemente en su capacidad de penetrar en las membranas biológicas.



**Figura 4.1.** Esquema de una emulsión “oil-in-water” donde la fase oil dispersada es un disolvente orgánico expandido con CO<sub>2</sub>.

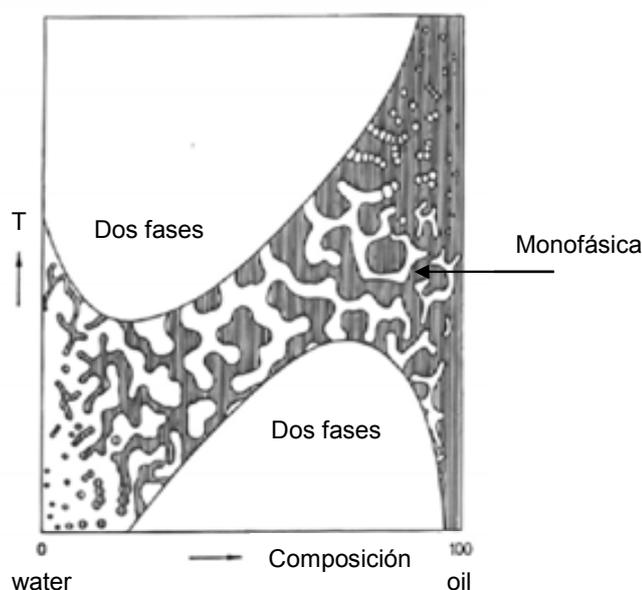
### 4.1 Introducción

Una emulsión es un sistema heterogéneo formado por dos líquidos inmiscibles. Desde hace años, las emulsiones son un importante sujeto de estudio debido sus numerosas aplicaciones domésticas e industriales. En una emulsión, un líquido (la fase

discontinua) es dispersado en otro líquido (la fase continua), en el cual no es soluble. La mayor parte de las emulsiones constan de un líquido polar, como el agua y otro apolar, como un aceite, un hidrocarburo ó un disolvente orgánico.<sup>(1)</sup> Históricamente, estos sistemas dispersos se clasifican en emulsiones y microemulsiones (ver Tabla 4.1).<sup>(2)</sup>

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, es decir, con el tiempo siempre se da una separación de sus fases, aunque a veces pueden presentar una cierta estabilidad cinética que retarda la separación, y se caracterizan porque su generación no suele ser espontánea. El diámetro medio de las gotitas dispersas puede ser desde nanométrico a micrométrico.<sup>(2)</sup>

El segundo tipo de emulsiones, las microemulsiones son sistemas termodinámicamente estables que se pueden formar de manera espontánea, y requieren poca energía, y en las que el diámetro medio de las gotitas dispersas es nanométrico (5-100nm) y tienen un aspecto transparente o translucido azulado.<sup>(1)(3)(4)</sup>



**Figura 4.2.** Esquema de la estructuración adoptada por una mezcla formada por agua, un disolvente orgánico y un compuesto anfílico en función de la composición y temperatura del sistema. A una concentración constante del compuesto anfílico, se observa una región monofásica formada por dispersiones homogéneas “agua/disolvente orgánico/anfílico” que se extiende desde el lado rico en agua al lado rico en disolvente orgánico. El tramado de la zona monofásica indica la microestructura de la disolución homogénea. La región monofásica está delimitada por dos regiones bifásicas donde la mezcla “agua/disolvente orgánico/anfílico” se escinde en dos fases bajo determinadas condiciones de temperatura y composición.<sup>(3)</sup>

Las microemulsiones se definen como fases termodinámicamente estables, constituidas por una mezcla homogénea en la que dos de sus componentes no son miscibles entre sí, y existe al menos un tercer componente de carácter anfifílico. Las microemulsiones son mezclas homogéneas a nivel macroscópico, pero su estructura es heterogénea a nivel submicroscópico. Mediante experimentos de dispersión de luz (light scattering), microscopía electrónica, resonancia magnética nuclear, etc.,<sup>(1)</sup> se ha observado que la estructura de estas fases puede modificarse por cambios de temperatura o composición hasta alcanzar un punto en el que el sistema se escinde en dos fases (ver Figura 4.2).

**Tabla 4.1.** Clasificación de las emulsiones y sus características.<sup>(2)</sup>

| Emulsiones                          | Microemulsiones                      |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| - Termodinámicamente inestables     | - Termodinámicamente estables        |
| - Cinéticamente estables            |                                      |
| - Aspecto turbio                    | - Aspecto transparente ó translucido |
| - Formación no espontánea           | - Formación espontánea               |
| - Tamaño nanométrico y micrométrico | - Tamaño nanométrico.                |

En función de la naturaleza de sus fases discontinua y continua, las emulsiones y las microemulsiones se clasifican en sistemas aceite-en-agua (“oil-in-water”, o/w) y sistemas agua-en-aceite (“water-in-oil”, w/o). En las emulsiones y microemulsiones w/o, el aceite forma la fase continua que rodea a pequeñas gotitas de un fase acuosa que constituyen la fase discontinua. En las emulsiones y microemulsiones o/w, la fase acuosa es la fase continua que rodea a las gotitas de aceite que constituyen la fase discontinua. Finalmente, las emulsiones y microemulsiones también se pueden clasificar en función de su concentración en diluidas, concentradas y muy concentradas.

#### **4.1.1 Microemulsiones como reactores y contenedores a escala nanoscópica**

Las microemulsiones tienen propiedades interfaciales especiales que permiten un contacto íntimo, a escala nanométrica, entre los dominios hidrofílicos e hidrofóbicos de las mismas, lo que permite que puedan realizarse modificaciones de estos sistemas de manera homogénea y controlada. Las principales características de una microemulsión son su carácter dinámico, es decir, que se producen intercambios continuos de

materiales entre los diferentes dominios, y la capacidad que tienen de formarse y destruirse de una manera reversible, mediante variaciones de temperatura y composición.<sup>(1),(5)</sup>

Las características estructurales y dinámicas de las microemulsiones, han motivado que durante los últimos años exista un creciente interés en la utilización de este tipo de sistemas como reactores o contenedores a escala submicrónica o nanoscópica.<sup>(6)</sup> Este tipo de sistemas han mostrado ser eficientes en la preparación de materiales moleculares nanoestructurados que no pueden prepararse de manera convencional, para la realización a escala nanoscópica de reacciones catalíticas o enzimáticas, para mimetizar procesos de biomineralización y para disminuir el efecto de la “sobreconcentración” y del “sobrecalentamiento” al adicionar reactivos en taques de reacción.<sup>(3),(7)</sup> Así, durante los últimos 20 años, las microemulsiones líquidas han sido usadas como nanoreactores para la síntesis de nanopartículas de materiales de naturaleza orgánica e inorgánica,<sup>(7)</sup> tales como metales (Ni, Au) y sales metálicas (CdS, ZnS, AgCl),<sup>(8)</sup> óxidos magnéticos (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y F<sub>2</sub>O<sub>3</sub>),<sup>(9)</sup> silicatos y carbonatos (zeolitas, CaCO<sub>3</sub>)<sup>(10),(11)</sup> y polímeros (látex).<sup>(12)</sup> En todos esos casos, las gotitas dispersadas de dimensiones nanoscópicas de la microemulsión, actúan como plantillas donde la formación de las partículas se da de manera confinada. En la mayor parte de los procesos de síntesis de nanopartículas a través de microemulsiones, descritos en la literatura, se utilizan tensoactivos.<sup>(8)</sup> El papel principal de los tensoactivos es el de reducir los requerimientos energéticos necesarios para la generación de la microemulsión, y mejorar las propiedades interfaciales entre los dominios hidrofílicos e hidrofóbicos. En este tipo de precipitaciones confinadas, las condiciones de operación y el método de recuperación del precipitado son determinantes de la distribución de tamaños y de la dispersabilidad del material final.<sup>(13)</sup>

Otro gran campo de aplicación de las microemulsiones líquidas como nanoreactores, es el de la síntesis química. Las emulsiones son ideales para la realización de reacciones confinadas en el núcleo de las gotitas dispersas en el medio continuo.<sup>(7)</sup> La utilización de microemulsiones como medio de reacción ha permitido superar numerosos problemas relativos a la insolubilidad de algunos reactivos, ya que estos sistemas presentan la capacidad de solubilizar sustancias polares y apolares, así como de compartimentar y concentrar los distintos reactivos de una reacción. Así, las microemulsiones han mostrado ser efectivas para llevar a cabo reacciones de polimerización,<sup>(4)</sup> catalíticas, solvolíticas y de hidrólisis.<sup>(8)</sup> Un ejemplo conocido es la

hidrólisis del lípido insoluble fosfatidilcolina mediante la enzima hidrofílica fosfolipasa A2.<sup>(14)</sup>

Aparte de su aplicación como plantillas para la síntesis controlada de partículas, y como medio de reacción, las microemulsiones también tienen importantes aplicaciones en otros sectores industriales.<sup>(4)</sup> Por ejemplo, en el campo farmacéutico, cosmético y nutracéutico se utilizan estos sistemas como contenedores o vehículos de transporte, para mejorar la eficiencia en el suministro de activos, su biodisponibilidad y su protección frente a procesos de degradación.<sup>(15)</sup> Así, las microemulsiones han sido empleadas para la administración de grasas, vitaminas y carbohidratos por vía intravenosa,<sup>(16)</sup> ó para el suministro de moléculas de ADN por vía pulmonar.<sup>(17)</sup>

El principal inconveniente del uso de las microemulsiones como nanoreactores, constituidas por un disolvente orgánico y que contienen un tensoactivo, es la separación y eliminación de los compuestos apolares de los productos finales.<sup>(18)</sup> Un ejemplo destacado de esta problemática ocurre en la recuperación de proteínas desde microemulsiones w/o.<sup>(19)</sup> En los procesos de preparación de materiales micro- y nanoparticulados, utilizando microemulsiones líquidas, los productos finales se separan de la microemulsión mediante procesos de floculación ó evaporación inducidos por cambios de temperatura o la adición de agentes químicos que provoquen la rotura de la microemulsión.<sup>(13)</sup> En muchos casos, estos procesos son bastantes problemáticos dada la presencia de grandes cantidades de tensoactivos y a la mala transmisión de los cambios de temperatura y/o de composición en las mezclas líquidas, lo que dificulta el control de las características de las partículas finales y provoca dificultades importantes en los procesos de escalado.<sup>(20)</sup>

Por tanto, hoy en día, el desarrollo de nuevas metodologías reproducibles y escalables para preparar microemulsiones, que puedan ser utilizadas como nanoreactores ó nanocontenedores, es de suma importancia tanto desde el punto de vista industrial como académico.<sup>(21)(22)</sup> Así pues, para que las microemulsiones puedan utilizarse a escala industrial como nanoreactores para la fabricación de materiales nanoestructurados o la realización de reacciones confinadas,<sup>(7)</sup> es necesario encontrar sistemas en los que la formación y destrucción de microemulsiones sea reversible, fácil de realizar y reproducible en el escalado. Por otro lado, también es de gran importancia, que la separación de los productos finales sea sencilla y con el mínimo impacto ambiental posible.

### 4.1.2 Microemulsiones con fluidos comprimidos

Durante las dos últimas décadas, los fluidos comprimidos (FCs), como por ejemplo el CO<sub>2</sub>, han empezado a ser considerados como disolventes adecuados para la formación de microemulsiones. Se ha comprobado que estos gases densos son capaces de solventar algunas de las limitaciones relacionadas con las microemulsiones líquidas convencionales.<sup>(18),(23)(24)</sup> Esto es debido a que las propiedades de los FCs, tales como la densidad, difusividad, viscosidad y constante dieléctrica, pueden ser modificadas muy fácilmente mediante simples cambios de presión y temperatura del sistema. Por tanto, el uso de los FCs para la generación de microemulsiones tiene ventajas significativas, ya que su formación, manipulación y destrucción pueden gobernarse mediante cambios de presión, además de por cambios de temperatura y composición, como en el caso de microemulsiones líquidas. En efecto, los cambios de presión se transmiten de una manera mucho más rápida que los cambios de temperatura y composición, lo que permite modificar la estructura de la microemulsión de manera muy homogénea sin la necesidad de emplear sistemas eficientes de agitación.<sup>(22)</sup> Todas estas propiedades explican porque desde el principio de este siglo hay un creciente interés en la formación de microemulsiones con FCs y en su utilización como nanoreactores.<sup>(25),(26)</sup>

Las principales ventajas de las emulsiones preparadas con FCs, respecto a aquellas basadas únicamente en disolventes líquidos, son la rápida separación y fácil eliminación del disolvente de los productos finales, así como las mayores velocidades de reacción y transporte entre sus distintos dominios.<sup>(13),(27)</sup> Asimismo, se ha comprobado que la estabilidad de las microemulsiones basadas en FCs y agua depende de la densidad del medio, la cual puede ser modificada mediante cambios de presión y temperatura. Por tanto, una de las principales ventajas de utilizar los FCs, es que permiten formar y destruir las microemulsiones, mediante cambios de presión, los cuales se transmiten de manera más eficiente que los cambios de temperatura o composición, necesarios para formar o destruir microemulsiones constituidas por componentes líquidos.<sup>(18)</sup>

El CO<sub>2</sub> es uno de los fluidos comprimidos (FC) más utilizados, ya que es muy abundante en la naturaleza, es un gas no inflamable, esencialmente no tóxico, y es muy barato.<sup>(28)</sup> El CO<sub>2</sub> es un buen disolvente para muchos compuestos orgánicos y organometálicos de baja polaridad a elevadas presiones, mientras que es un disolvente pobre para compuestos polares, debido a su baja constante dieléctrica y la debilidad de las

interacciones de van der Waals que es capaz de establecer.<sup>(29)</sup> Una de las principales características del CO<sub>2</sub>, es que su poder disolvente puede ser modificado mediante cambios de presión y temperatura, lo que permite manipular las propiedades de las microemulsiones y romper las mismas rápidamente al final del proceso mediante despresurización con la consecuente eliminación del CO<sub>2</sub>.<sup>(21)</sup> Asimismo, la estructura de las microemulsiones preparadas con CO<sub>2</sub> pueden modificarse mediante cambios de composición (modificación de la fracción molar de CO<sub>2</sub>, adición de alcoholes y sales), así como de temperatura y de presión.<sup>(26)</sup>

Las microemulsiones preparadas con CO<sub>2</sub> se clasifican en dos grandes grupos, en sistemas agua-en-CO<sub>2</sub> (“water-in-CO<sub>2</sub>”, w/CO<sub>2</sub>) y sistemas CO<sub>2</sub>-en-agua (“CO<sub>2</sub>-in-water”, CO<sub>2</sub>/w). Las microemulsiones w/CO<sub>2</sub> fueron las primeras emulsiones desarrolladas con CO<sub>2</sub> como alternativa a los disolventes orgánicos.<sup>(30)</sup> Se caracterizan porque el CO<sub>2</sub> constituye la fase continúa que rodea a pequeñas gotitas de fase acuosa de dimensiones nanoscópicas, y porque en la mayor parte de los casos se necesitan tensoactivos solubles en CO<sub>2</sub> para estabilizarlas. Entre otras aplicaciones, las emulsiones w/CO<sub>2</sub> han sido utilizadas como nanoreactores para la síntesis de nanopartículas de Ag,<sup>(22),(31)</sup> CdS,<sup>(26)</sup> Cu,<sup>(13)</sup> ZnS,<sup>(13)</sup> Pd,<sup>(18)</sup> y polímeros porosos,<sup>(25)</sup> También se han utilizado este tipo de sistemas para la solubilización de sustancias hidrófilas, tales como proteínas (BSA, bovine serum albumin) y enzimas,<sup>(25),(30)</sup> y en la preparación de suspensiones de nanopartículas de plata.<sup>(32)</sup>

Respecto al otro tipo de microemulsiones, las CO<sub>2</sub>/w, es de destacar que han sido muy poco estudiadas hasta la fecha, aunque ahora están recibiendo una atención creciente, ya que se ha comprobado que este tipo de sistemas pueden ofrecer nuevas oportunidades en la formación de nanopartículas con un tamaño controlado,<sup>(25)</sup> en la solubilización y separación de proteínas, de metales pesados e iones, y para llevar a cabo reacciones de catálisis enzimática.<sup>(21)</sup> Este tipo de microemulsiones se caracterizan por tener una fase continua de naturaleza acuosa que rodea a pequeñas gotitas de CO<sub>2</sub> comprimido, las cuales son estabilizadas mediante tensoactivos solubles en agua. Este tipo de microemulsiones están despertando un gran interés como nanoreactores para preparar compuestos CO<sub>2</sub>-fílicos nanoestructurados mediante procesos de precipitación o reacción.

Dada la experiencia en disolventes expandidos con CO<sub>2</sub> de nuestro grupo de investigación, en el cual se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral,<sup>(33)</sup> en este trabajo

se ha estudiado la viabilidad de utilizar sistemas “disolvente orgánico/agua/CO<sub>2</sub>” para preparar microemulsiones o/w donde la fase discontinua sea un disolvente expandido con CO<sub>2</sub>. El interés en estos sistemas, es su potencial utilización como nanoreactores para procesar materiales moleculares nanoestructurados. Estos sistemas pueden tener propiedades muy similares a las microemulsiones CO<sub>2</sub>/w, permitiendo además, gracias a su mayor poder solvatante, nanoestructurar compuestos orgánicos insolubles en CO<sub>2</sub> puro.

## **4.2 Microemulsiones o/w con disolventes orgánicos expandidos con CO<sub>2</sub>**

### **4.2.1 Criterios de elección de los componentes de la microemulsión**

Durante la última década, el estudio de diagramas de fases de mezclas binarias y ternarias a alta presión, en la cuales uno de los componentes es un gas, ha recibido mucha atención. Hasta el momento, la mayor parte de este trabajo ha estado centrado en sistemas no-acuosos (Gregorowick et al,<sup>(38)(39)</sup> Hong et al,<sup>(40)</sup> y Peters et al.<sup>(41)</sup>), mientras que los sistemas que contienen agua o disolventes orgánicos polares solubles en agua, tales como los alcoholes ó ácidos carboxílicos, han recibido una menor atención.

Sin embargo, tal y como está descrito en la literatura,<sup>(42)</sup> estos sistemas presentan un diagrama de fases muy interesante, ya que mezclas homogéneas de disolventes orgánicos con agua, son capaces de escindirse en dos fases líquidas mediante la adición de un gas, como el CO<sub>2</sub>, a alta presión. Efectivamente, se ha observado en varios sistemas que la adición de CO<sub>2</sub>, a una cierta presión, sobre una mezcla formada por un disolvente orgánico y agua, con un rango de miscibilidad bastante amplio, provoca una separación de fases. Elgin y Weinstock denominaron a este fenómeno de separación de fases, como “salting out with a supercritical gas”, por la similitud al comportamiento observado en una disolución orgánica-acuosa al adicionar una sal, y observar la escisión del sistema en dos fases líquidas.<sup>(34)</sup> En base a este comportamiento, en la presente Tesis Doctoral, se pensó en emplear los sistemas “disolvente orgánico/agua/CO<sub>2</sub>” para obtener microemulsiones o/w, en las que dominios de dimensiones nanoscópicas de

disolventes expandidos con CO<sub>2</sub> estuviesen dispersos en una fase continua acuosa. Estos sistemas y sus componentes debían cumplir los requisitos que se detallan a continuación:

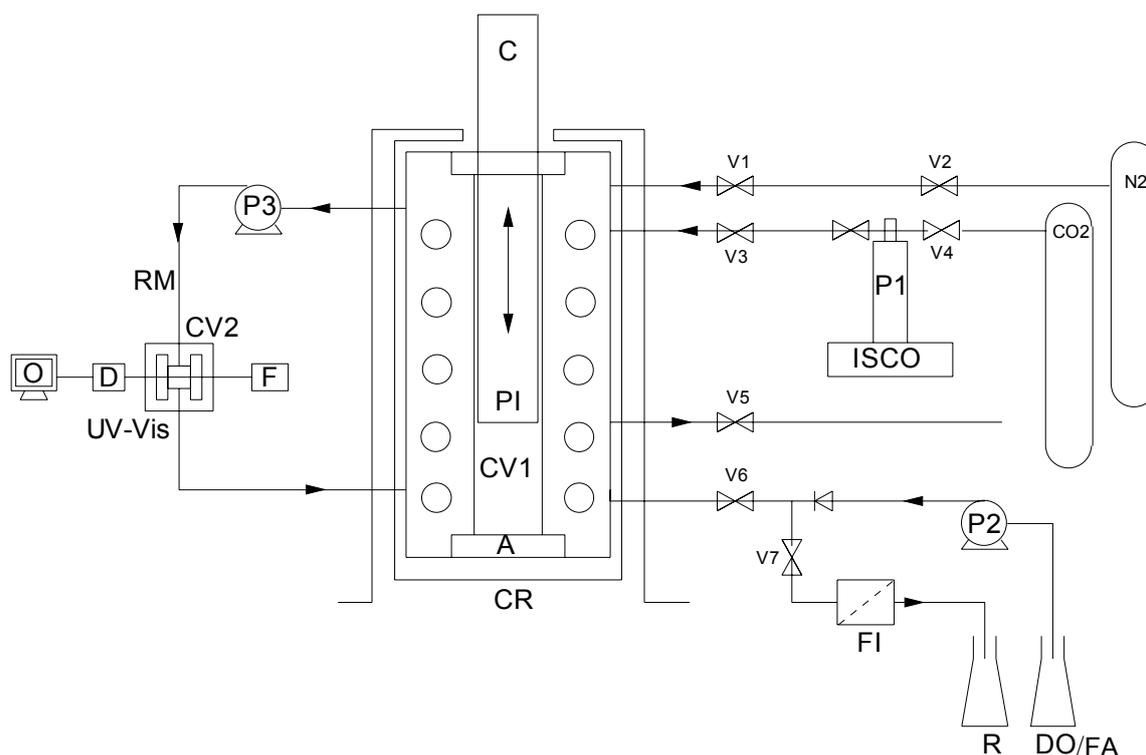
1. Inmiscibilidad del CO<sub>2</sub> y el agua a las condiciones de presión y temperatura del sistema, en ausencia del disolvente orgánico.
2. Completa miscibilidad del disolvente orgánico con el agua a las condiciones de presión y temperatura del sistema, en ausencia del CO<sub>2</sub>.
3. Completa miscibilidad del disolvente orgánico y el CO<sub>2</sub> a las condiciones de presión y temperatura del sistema, en ausencia de agua.
4. Existencia de unas determinadas condiciones de presión, temperatura y composición, en las que el sistema se encontrase constituido por dos fases líquidas, una rica en agua y otra en disolvente orgánico.
5. Capacidad de eliminar el CO<sub>2</sub> del sistema mediante reducción de la presión.

Teniendo en cuenta los requisitos enumerados anteriormente, en la presente Tesis se ha estudiado la bondad de los sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” y “etanol/agua/CO<sub>2</sub>”, para formar microemulsiones o/w con disolventes expandidos con CO<sub>2</sub> como fase apolar. Acorde con la bibliografía consultada, la adición de CO<sub>2</sub>, bajo ciertas condiciones de presión y temperatura, sobre mezclas de una sola fase “acetona/agua” y “etanol/agua” conduce a la separación del sistema en dos fases, una rica en disolvente orgánico y otra rica en agua.<sup>(35)</sup>

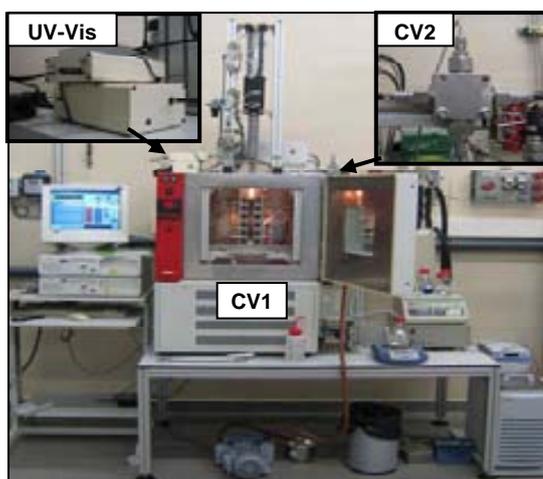
#### **4.2.2 Equipamiento y protocolo general de operaciones establecido para estudiar la viabilidad de formar microemulsiones con sistemas “disolvente orgánico/agua/CO<sub>2</sub>”**

##### ***Equipamiento***

El comportamiento de fases de los sistemas “disolvente orgánico/agua/CO<sub>2</sub>” y su bondad para formar microemulsiones, en presencia o ausencia de tensoactivos, se llevó a cabo en un analizador de fases a alta presión basado en una celda de volumen variable (descripción detallada en la Parte Experimental). La configuración experimental que se diseñó y se puso en marcha, es la que se representa en la Figura 4.3.



**Figura 4.3.** Esquema del equipamiento empleado para la preparación de emulsiones. A: sistema de agitación; C: cilindro neumático; CV1: celda de volumen variable; CV2: celda espectroscópica de alta presión; CR: cámara de calor o frío; D: detector UV-Vis; DO: disolvente o disolución orgánica; FA: fase acuosa; F: fuente de luz UV-Vis; FI: filtro; O: sistema de captación de datos; P: bomba; PI: pistón; R: residuo; RM: sistema de recirculación; V: válvula.



**Figura 4.4.** Imagen del analizador de fases *CV1* rediseñado con un espectrofotómetro de UV-Visible y una celda espectroscópica de flujo a alta presión *CV2*.

El analizador de fases está formado por un reactor de alta presión (tipo Jerguson), *CVI*, de volumen variable, construido con acero inoxidable y equipado con dos mirillas laterales de zafiro. El elemento que permite la variación del volumen interno de la celda es un pistón, *PI*, de acero inoxidable 316 que se introduce dentro del reactor hasta una profundidad máxima de 20 cm. La celda de volumen variable está situada en el interior de una cámara de temperatura, *CR*, que permite alcanzar temperaturas de trabajo mínima y máxima de -35°C y 180°C respectivamente. El fluido interno de la celda se homogeneiza mediante una bomba externa de recirculación, *P3*. El analizador consta además de un transductor de presión y una sonda de temperatura para el registro continuo de ambos parámetros. El volumen mínimo del reactor es de 50 mL cuando el pistón se encuentra a la máxima profundidad, mientras que cuando éste se encuentra a la mínima profundidad, el volumen del reactor es de 75 mL. El CO<sub>2</sub> se introduce en la celda por medio de una bomba de jeringa, *PI*, a través de la apertura de la válvula, *V3*. El N<sub>2</sub> llega directamente desde una bombona a una presión determinada regulada por un manorreductor. El N<sub>2</sub> se introduce en la celda a través de la apertura de la válvula *V1*. La alimentación de disolventes o disoluciones orgánicas hacia el interior del reactor se realiza a través de la válvula *V6*, y para ello se utiliza una bomba de alta presión de pistón, *P2*. La apertura de las válvulas *V6* y *V7* permite la evacuación de los fluidos presentes en el interior de la celda. En el presente trabajo de Tesis Doctoral, se conectó en serie la celda de volumen variable *CVI* a una celda espectroscópica de flujo a alta presión *CV2* a través del circuito de recirculación *RM*. *CV2* es una celda de volumen constante de 7mL y con un camino óptico de 1cm. Dicha celda *CV2* se conectó a su vez, a través de fibra óptica, a un espectrofotómetro de ultravioleta-visible, lo que permite registrar espectros de los sistemas a alta presión desde 200 a 800nm en 0,65s. Asimismo, en este trabajo se ha utilizado para la adquisición de espectros consecutivos en el tiempo.

### ***Protocolo general de operación***

El protocolo general de operaciones que se diseñó para analizar el comportamiento de fases de sistemas “disolvente orgánico/agua/CO<sub>2</sub>” y su viabilidad para formar microemulsiones, empleando la configuración experimental esquematizada y representada en las Figura 4.3 y 4.4, es el que se describe a continuación:

1. Un volumen conocido de disolvente orgánico se carga dentro de la celda de volumen variable *CVI* a presión atmosférica a través de la bomba *P2* previamente cebada, mediante la apertura de la válvula *V6*. Durante todo este proceso la celda *CVI* se mantiene termostata a la temperatura de trabajo  $T_w$ .
2. Un volumen conocido de agua, que puede contener o no tensoactivo, se adiciona dentro de la celda *CVI* a través de la bomba *P2*, previamente cebada, mediante la apertura de la válvula *V6*.
3. Activación del sistema de recirculación *RM* entre la celda de volumen variable *CVI*, y la celda espectroscópica *CV2* mediante la bomba *P3*, a las condiciones de trabajo, durante 30 minutos para que se alcance el equilibrio térmico y conseguir una completa homogeneización de los dos líquidos.
4. Presurización de la celda de alta presión *CVI*, y por tanto también *CV2*, mediante la adición de  $\text{CO}_2$ , hasta la fracción molar de  $\text{CO}_2$  deseada,  $X_w$ , utilizando la bomba de jeringa *P1* y la apertura de las válvulas *V3* y *V4*, alcanzando una presión de trabajo  $P_w$ . Para aumentar la velocidad de mezclado entre el  $\text{CO}_2$  y la disolución inicial de agua más disolvente orgánico, durante esta etapa es conveniente tener activado el sistema de recirculación *RM*. La presión  $P_w$  también puede ser modificada mediante el desplazamiento vertical del pistón neumático, manteniendo constante la fracción molar de  $\text{CO}_2$ ,  $X_w$ , y la composición del sistema.
5. Activación del sistema recirculación durante 30 minutos para conseguir una completa homogeneización y alcanzar el equilibrio térmico. Transcurrido dicho tiempo, se desactiva la recirculación y se deja estabilizar el sistema durante 15 minutos.
6. Estudio de los cambios de fases del sistema y de su estructura, al variar  $P$ ,  $X_{\text{CO}_2}$  o  $T$ , mediante una inspección visual de la celda *CVI*, y el análisis del espectro de absorción de ultravioleta-visible, registrado mediante un espectrofotómetro de ultravioleta-visible acoplado a la celda espectroscópica *CV2* (ver Parte Experimental).

Los cambios estructurales experimentados por los sistemas “disolvente orgánico/agua/ $\text{CO}_2$ ” al ser sometidos a variaciones de  $P_w$  y  $X_w$ , se caracterizaron mediante inspección visual y midiendo la variación de la densidad óptica del sistema. La densidad óptica (O.D.) se define como la absorbancia ( $A$ ) que presenta un

determinado elemento óptico a una longitud de onda ( $\lambda$ ) por unidad de camino óptico del elemento (l).

$$OD_{\lambda} = A_{\lambda}/l \quad (1)$$

El sistema no debe absorber a la longitud de onda ( $\lambda$ ) seleccionada para llevar a cabo las medidas de densidad óptica. Una medida de densidad óptica no deja de ser una medida de la turbidez del sistema, es decir, es una medida de la luz dispersada por la muestra. A través de medidas de densidad óptica, es posible detectar cambios de fases en sistemas líquidos a nivel micro- y nanoscópico.<sup>(36)</sup> Los valores de densidad óptica de una determinada muestra están estrechamente ligados a la concentración y tamaño de las fases que la constituyen. Así, una disolución de un compuesto correspondiente a una única fase líquida homogénea, tendrá un valor de densidad óptica igual a 0, mientras que un sistema heterogéneo que no sea ópticamente transparente, como por ejemplo una emulsión, un sistema vesicular, ó una suspensión de partículas presentará valores de densidad óptica superiores a cero. Ahora bien, los sistemas formados por una sola fase ópticamente transparente, estables termodinámicamente, pero con una cierta estructuración a nivel nanoscópico, como las micelas o las microemulsiones, tienen valores de densidad óptica distintos de cero, e inferiores a los que presentan los sistemas heterogéneos de varias fases. Por ejemplo, la densidad óptica ha sido utilizada para estudiar mecanismos de transición entre vesículas y micelas mediante la dilución del sistema, y para estudiar el comportamiento de fases de mezclas de tensoactivos susceptibles de formar vesículas (liposomas) bajo ciertas condiciones.<sup>(37)</sup>

Así, la medida de la variación de la densidad óptica de un sistema permite detectar cambios estructurales en sistemas “disolvente orgánico/agua/CO<sub>2</sub>” a nivel micro- y nanoscópico, como por ejemplo, la formación y destrucción de microemulsiones, las cuales son imposibles de detectar por inspección visual.

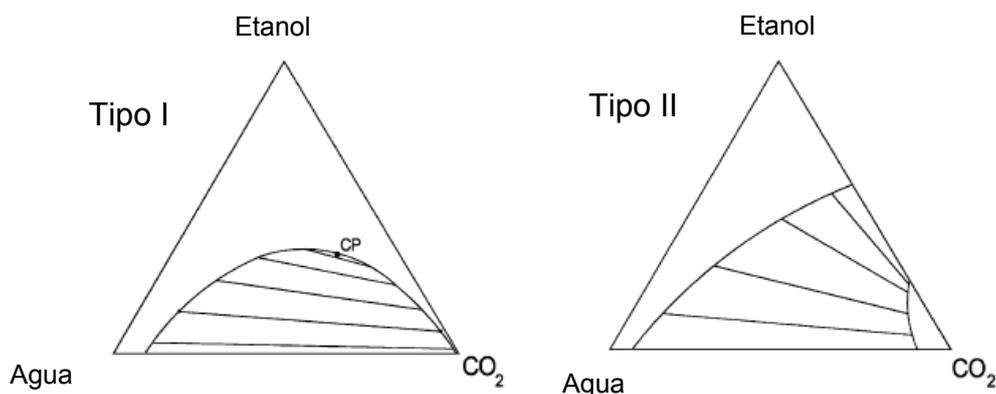
### **4.2.3 Microemulsiones en el sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>”**

#### **4.2.3.1 Diagrama de fases del sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>”**

Desde hace años, en los sectores tecnológicos que utilizan los fluidos comprimidos como disolventes alternativos a los orgánicos se han interesado por los

sistemas formados por “etanol/agua/CO<sub>2</sub>”, ya que son muy asequibles y tienen un coste bajo. Dicho sistema posee un diagrama de fase muy interesante, ya que las mezclas homogéneas de etanol con agua pueden separarse en dos fases líquidas al adicionar un gas, como el CO<sub>2</sub> a alta presión.<sup>(45)</sup> En base a este comportamiento, en el presente trabajo se pensó en estudiar la idoneidad de este sistema para preparar microemulsiones o/w, termodinámicamente estables, constituidas por dominios nanoscópicos de etanol expandido con CO<sub>2</sub> dispersos en una fase acuosa. Este sistema cumple con los criterios definidos en el Apartado 4.2.1, ya que el etanol es un disolvente orgánico polar completamente miscible con el agua a temperatura ambiente y a presión atmosférica, y presenta una miscibilidad total con el CO<sub>2</sub> a P>10MPa y T=298K.<sup>(46)</sup>

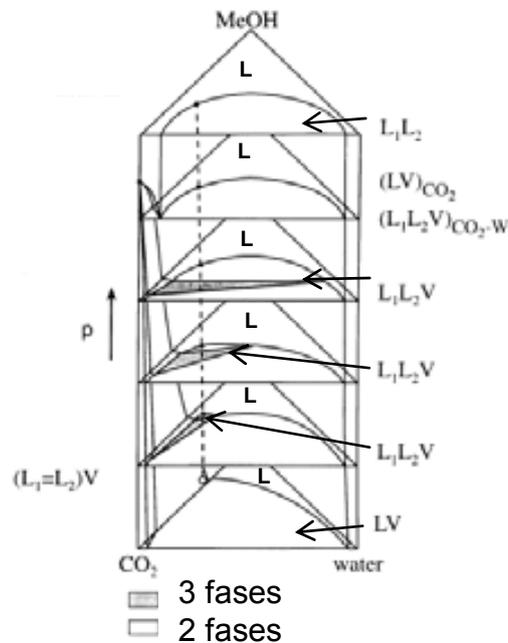
Antes de describir esos experimentos es conveniente recordar algunos precedentes previos del sistema “etanol/agua/ CO<sub>2</sub>”. Existen numerosos estudios del diagrama de fases en equilibrio de dicho sistema descritos a lo largo de las últimas cinco décadas, entre los que caben destacar principalmente las investigaciones realizadas, tanto desde un punto vista experimental como teórico, por Takishima,<sup>(47)</sup> Yoon-Lee,<sup>(48)</sup> y Efremova-Shvartz.<sup>(49)</sup> De acuerdo con esos trabajos, el sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>” puede presentar dos tipos de comportamiento de fases (I y II), dependiendo del autor consultado y de las condiciones de trabajo, que se muestran en la Figura 4.5.<sup>(50)</sup>



**Figura 4.5.** Esquemas cualitativos de los dos tipos de diagramas de fase de la mezcla ternaria “etanol/agua/CO<sub>2</sub>” a presión y temperatura constante.<sup>(50)</sup>

El diagrama de fases de este sistema es muy particular, ya que presenta un punto azeotrópico cerca de las condiciones críticas de presión y temperatura del CO<sub>2</sub>. Un azeótropo se define como una mezcla líquida de dos o más sustancias que se comporta como una sustancia única. En este punto, el vapor generado por la evaporación parcial

del líquido tiene la misma composición que el líquido. En este caso el etanol y el agua forman una mezcla azeotrópica cerca de las condiciones críticas del CO<sub>2</sub>. Brunner et al. sostienen que es imposible romper ese punto azeotrópico con CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas (T=313-323K y P=10,1MPa).<sup>(50)</sup> Como consecuencia directa de esta característica no se puede obtener una fase rica en alcohol independiente de la fase rica en agua. Por lo tanto, el sistema en este caso presentará un comportamiento de fases del tipo I. Sin embargo, otros autores, tales como Lim y Nagahama,<sup>(51)</sup> defienden que la fase orgánica se podría escindir de la fase acuosa totalmente y solubilizarse en la fase gas, formada principalmente por CO<sub>2</sub>. Esta separación se llevaría a cabo a presiones por debajo de la presión crítica de la mezcla binaria etanol/CO<sub>2</sub> (P=10,1MPa) y en un rango de temperaturas comprendidas entre 333-383K, muy por encima de las condiciones críticas. En este caso el diagrama de fases del sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>” sería del tipo II. En la literatura también se encuentra descrito el comportamiento de fases del sistema “metanol/agua/CO<sub>2</sub>”, parecido al del sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>” a T=304K y en el rango de P=6,8-9,2MPa.<sup>(42)</sup> En la Figura 4.6 se encuentra representado el comportamiento de fases de este sistema mediante un prisma, constituido por la superposición de diagramas de fases triangulares a valores constantes de presión, en los que el valor de la presión aumenta de abajo a arriba.



**Figura 4.6.** Esquema del diagrama de fases del sistema “metanol/agua/CO<sub>2</sub>” a 304K en el rango de presiones comprendido entre 6,8-9,2 MPa.<sup>(42)</sup>

La nomenclatura utilizada para describir este tipo de diagramas se recoge en la Tabla 4.2.

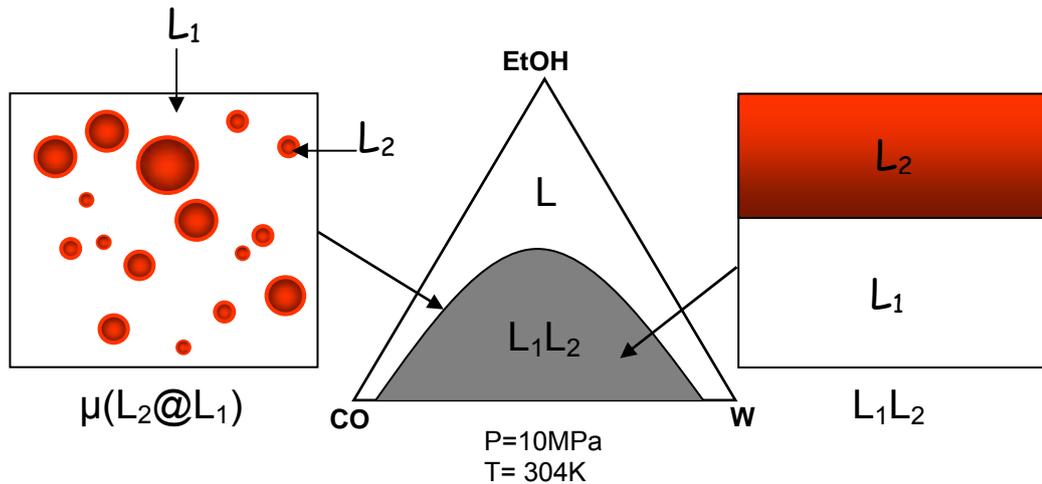
**Tabla 4.2.** Nomenclatura utilizada en los diagramas de fase del sistema “metanol/agua/CO<sub>2</sub>”

|                 |                    |   |                 |
|-----------------|--------------------|---|-----------------|
| MeOH            | Metanol            | P | Presión         |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono | T | Temperatura     |
| W               | Agua               | x | Fracción molar  |
| V               | Fase vapor         | 1 | Fase 1 acuosa   |
| L               | Fase líquida       | 2 | Fase 2 orgánica |

Tal y como se puede observar en la Figura 4.6, a bajas presiones, la región bifásica líquido-vapor LV se extiende desde el eje binario del dióxido de carbono-agua hasta el lado correspondiente al dióxido de carbono-metanol. A estas condiciones el metanol y el agua son completamente miscibles y se comportan como un único líquido. Conforme aumenta la presión, en la zona central del prisma, se puede observar la aparición de una región trifásica líquido-líquido-vapor L<sub>1</sub>L<sub>2</sub>V. El rango de existencia de dicha región trifásica va disminuyendo conforme se vaya incrementando la presión del sistema, mientras que la región bifásica en la que coexisten dos fases líquidas, L<sub>1</sub>L<sub>2</sub> va incrementándose progresivamente.<sup>(42),(48)</sup>

Desde un punto de vista experimental, para poder formar microemulsiones en las que la fase discontinua es la orgánica (L<sub>2</sub>) y la fase continua es la acuosa (L<sub>1</sub>), a las que denotaremos como μ(L<sub>2</sub>@L<sub>1</sub>), hemos de evitar trabajar a aquellas condiciones de presión, temperatura y composición, en las que el sistema se encuentre en un equilibrio de fases con una fase vapor V tales como L<sub>1</sub>V, L<sub>2</sub>V o L<sub>1</sub>L<sub>2</sub>V.<sup>(42), (52)</sup>

En base al comportamiento teórico descrito del diagrama de fases del sistema “metanol/agua/CO<sub>2</sub>, se decidió analizar la capacidad del sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>” para organizarse como microemulsión a P ≥ 9.2 MPa. A estas condiciones de presión, tal y como se representa en la Figura 4.7, se asumió que el sistema puede encontrarse o bien constituido por una sola fase L o bien por dos fases líquidas L<sub>1</sub>L<sub>2</sub>, donde la organización estructural de las fases pueden ser en forma de emulsiones, L<sub>1</sub>@L<sub>2</sub> o L<sub>2</sub>@L<sub>1</sub>, o de microemulsiones estables, μL<sub>1</sub>@L<sub>2</sub> o μL<sub>2</sub>@L<sub>1</sub>, donde L<sub>1</sub> es una fase o dominio acuoso, y L<sub>2</sub> es una fase o dominio orgánico.



**Figura 4.7.** Esquema cualitativo del diagrama de fases del sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>” a presión y temperatura constante.<sup>(42)</sup>

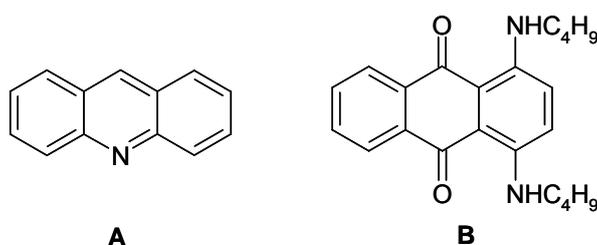
Así pues, tal y como se describe en detalle en el siguiente apartado, en este trabajo se ha estudiado la viabilidad de formar microemulsiones en base al sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>”, explorando la variación de la estructura a nivel sub-microscópico y nanoscópico de este sistema, al someterlo a cambios de presión y composición, en algunos puntos de la interfase entre la región bifásica L<sub>1</sub>L<sub>2</sub> y la monofásica L. En concreto, se analizó con detalle si bajo ciertas condiciones, en la transición desde una sola fase L a dos fases L<sub>1</sub>L<sub>2</sub>, el sistema forma emulsiones L<sub>2</sub>@L<sub>1</sub> o microemulsiones μ(L<sub>2</sub>@L<sub>1</sub>) termodinámicamente estables, en las que dominios nanoscópicos de la fase L<sub>2</sub> se encuentran dispersos en el medio continuo L<sub>1</sub> (ver Figura 4.7).

#### 4.2.3.2 Preparación de microemulsiones o/w en sistemas “etanol/agua/CO<sub>2</sub>”

En esta sección se describe el estudio mediante inspección visual de los cambios experimentados por el sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>” en algunos puntos de la interfase entre la zona bifásica L<sub>1</sub>L<sub>2</sub> y la zona monofásica L, al someterlos a variaciones de presión y de contenido en CO<sub>2</sub>.

Para poder facilitar el análisis del sistema por inspección visual, se emplearon dos colorantes distintos con solubilidades diferentes en agua y en acetona, y que permiten detectar la naturaleza de las fases líquidas que se forman. Los colorantes que se eligieron fueron la acridina de color amarillo, por ser soluble en etanol y agua, y el

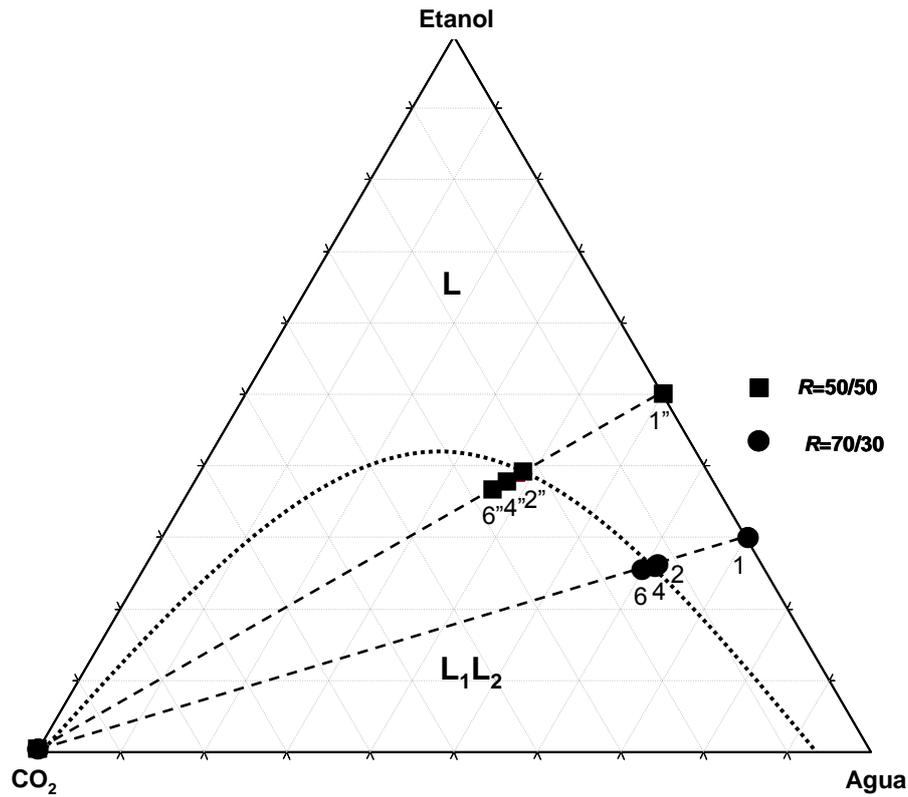
1,4-bis-(n-butilamino)-9,10-antraquinona, más conocido como “solvent blue 35” de color azul, por ser soluble solo en etanol, y ser insoluble en agua. Ambos colorantes son insolubles en CO<sub>2</sub> líquido. En todos los experimentos que se realizaron se introdujeron en la celda de medida 0,5mg de ambos colorantes disueltos en la fase orgánica, y se empleó la configuración experimental y el protocolo operacional descritos en el Apartado 4.2.2.



**Figura 4.8.** Representación de las estructuras químicas de los colorantes acridina (A) y “solvent blue 35” (B).

En primer lugar, tal y como se representa en la Figura 4.9, se estudió la evolución de los sistemas “etanol/agua/CO<sub>2</sub>” con una relación molar entre agua y etanol ( $R$ ) de 70/30 y 50/50, a 10MPa y 308K, al variar la fracción molar de CO<sub>2</sub>,  $X_{CO_2}$ . Así, sobre mezclas de etanol/agua con ( $R$ )=70/30 y 50/50, la cuales están constituidas por una sola fase líquida  $L$ , se añadió CO<sub>2</sub> siguiendo las líneas de trabajo, esquematizadas en la Figura 4.9, hasta que se produjo la separación del sistema en dos fases líquidas  $L_1$  y  $L_2$ . Este proceso se siguió mediante una inspección visual, a través de la mirilla de la celda de volumen variable, identificando aquellos valores de  $X_{CO_2}$  en los que se producen cambios en el sistema (ver Tabla 4.3). Gracias a la presencia de colorantes en el sistema, fue posible caracterizar la naturaleza de las distintas fases que iban apareciendo.

Tal y como muestran las imágenes de la Figura 4.10 y los datos recogidos en la Tabla 4.3, también se estudió la evolución de algunos sistemas, representados por números en negrita en la Tabla 4.3, al aumentar la presión desde 10 hasta 14MPa.

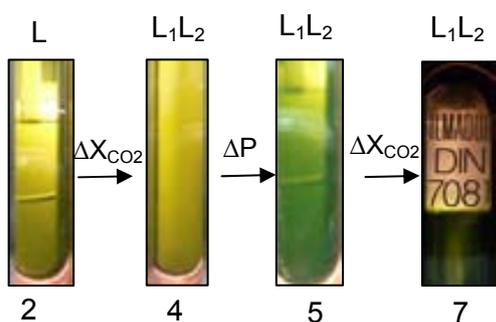


**Figura 4.9.** Diagrama de fases cualitativo del sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>”. Líneas de trabajo (---) que muestran la evolución de la composición de los sistemas con  $R=50/50$  (■) y  $R=70/30$  (●) a 308K y 10MPa, al variar el contenido en CO<sub>2</sub>. Los números indican el punto de la Tabla 4.3 al que corresponde cada señal.

**Tabla 4.3.** Análisis de fases de los sistemas “etanol/agua/CO<sub>2</sub>” con  $R=70/30$  y  $R=50/50$ , a la temperatura de 308K, al variar la presión y el contenido en CO<sub>2</sub> conteniendo los colorantes A y B.

|             | Punto | P(MPa) <sup>a</sup> | X <sub>CO<sub>2</sub></sub> <sup>b</sup> | Inspección visual | Color            | Fases <sup>c</sup>            |
|-------------|-------|---------------------|--|-------------------|------------------|-------------------------------|
| $R=70/30^d$ | 1     | 10                  | 0  | Transparente      | Verde            | L                             |
|             | 2     | 10                  | 0,34                                     | Transparente      | Verde            | L                             |
|             | 3     | 14                  | 0,34                                     | Transparente      | Verde            | L                             |
|             | 4     | 10                  | 0,35                                     | Turbio            | Verde            | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub> |
|             | 5     | 14                  | 0,35                                     | Transparente      | Verde            | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub> |
|             | 6     | 10                  | 0,42                                     | Separación        | Verde + Incoloro | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub> |
|             | 7     | 14                  | 0,42                                     | Separación        | Verde + Incoloro | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub> |
| $R=50/50^d$ | 1''   | 10                  | 0  | Transparente      | Verde            | L                             |
|             | 2''   | 10                  | 0,38                                     | Transparente      | Verde            | L                             |
|             | 3''   | 14                  | 0,38                                     | Transparente      | Verde            | L                             |
|             | 4''   | 10                  | 0,41                                     | Turbio            | Verde            | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub> |
|             | 5''   | 14                  | 0,41                                     | Transparente      | Verde            | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub> |
|             | 6''   | 10                  | 0,42                                     | Separación        | Verde + Incoloro | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub> |
|             | 7''   | 14                  | 0,42                                     | Separación        | Verde + Incoloro | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub> |

[a] Presión del sistema. [b] X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=moles CO<sub>2</sub>/(moles CO<sub>2</sub>+moles etanol). [c] Fases observadas en el sistema: L, una sola fase líquida; L<sub>1</sub>L<sub>2</sub>, dos fases líquidas separadas. [d] Relación molar agua/etanol.



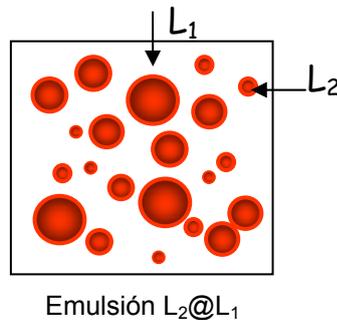
**Figura 4.10.** Imágenes de la evolución del sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>” con una relación molar de  $R=70/30$  al variar la presión y el contenido en CO<sub>2</sub>. La transición entre los puntos 2→4 es debida al incremento de  $X_{CO_2}$ , 4→5 a un incremento de presión y entre 5→7 a una nuevo incremento en la  $X_{CO_2}$  (ver Tabla 4.3).

Tal y como se recoge en la Tabla 4.3, el sistema “etanol/agua” con una relación molar inicial de agua/etanol de 70/30 y  $X_{CO_2}=0$  (Punto 1 – Tabla 4.3), está formado por una sola fase líquida L, que es de color verde debido a la presencia simultánea de los colorantes acridina y “solvent blue 35”, lo que indica que la fase está formada por una mezcla de etanol y agua. Este punto está representado por un símbolo ● sobre el eje etanol-agua del diagrama de fases. Al adicionar CO<sub>2</sub> hasta un valor de  $X_{CO_2}=0,34$  y 10MPa (Punto 2- Tabla 4.3 y Figura 4.10), se puede observar que el sistema sigue formado por una sola fase líquida verde L. A estas condiciones, se comprobó que un aumento de la presión del sistema hasta un valor de 14MPa (Punto 3 - Tabla 4.3), generado por un desplazamiento del pistón del analizador de fases, no tenía prácticamente ninguna repercusión aparente sobre la composición de las fases del sistema, manteniéndose el sistema en una sola fase líquida. Al continuar adicionando CO<sub>2</sub> hasta alcanzar un valor de  $X_{CO_2}=0,35$  manteniendo la presión a 10MPa, (Punto 4 – Tabla 4.3) se observa que el sistema se separa en dos fases líquidas, L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>. La fase más densa turbia, que se observa en la parte inferior de la celda, es de coloración verdosa, causada por la presencia de los colorantes acridina y “solvent blue 35”. Esto indica que esta fase es acuosa, L<sub>1</sub>, y tiene un elevado contenido en etanol. En cambio, la fase menos densa de naturaleza orgánica, L<sub>2</sub>, en la parte superior de la celda, es incolora debido a la ausencia de ambos colorantes, lo que indica su elevada riqueza en CO<sub>2</sub> y su bajo contenido en agua y etanol. La turbidez que presenta la fase L<sub>1</sub> es debida probablemente a la presencia de gotitas de L<sub>2</sub> en su seno. En este punto, si se incrementa la presión de 10 a 14MPa (Punto 5- Tabla 4.3), la fase L<sub>1</sub> rica en etanol y agua, pasa de ser turbia a transparente, coexistiendo con la fase líquida L<sub>2</sub> rica en CO<sub>2</sub> (ver Figura 4.10). En cambio, al disminuir la presión, el sistema se comporta como si de desgasificara. Si se sigue adicionando más CO<sub>2</sub> sobre el sistema, llega un momento a

$X_{CO_2}=0,42$  en el cual se produce una separación total de las fases  $L_1$  y  $L_2$ , y el volumen ocupado se incrementa notablemente (Punto 6- Tabla 4.3 y Punto 7 - Figura 4.10).

El estudio anterior también se realizó sobre el sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>” con una relación molar agua/etanol inicial ( $R$ ) de 50/50 (ver Tabla 4.3). Los resultados obtenidos fueron muy similares a los obtenidos cuando se emplea una relación inicial de  $R=70/30$ . Lo único destacable en este caso, es que la fracción molar de CO<sub>2</sub> a partir de la cual el sistema se separa en dos fases líquidas  $L_1L_2$  es superior en los sistemas con  $R=50/50$ .

Así pues, los resultados descritos en el presente apartado, indican que no es posible formar microemulsiones con sistemas “etanol/agua/CO<sub>2</sub>”, en las que la fase oil este formada por nanodominios de etanol expandidos con CO<sub>2</sub>,  $L_2$ , dispersos en un medio continuo acuoso,  $L_1$ . En este caso, el aumento de la  $X_{CO_2}$  en el sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>” provoca la separación del mismo en una fase acuosa muy rica en etanol,  $L_1$ , y una fase orgánica,  $L_2$ , constituida principalmente por CO<sub>2</sub>. Este diferente comportamiento se explica por la gran afinidad que tiene el etanol por el agua.<sup>(53)</sup> Este resultado reafirma la hipótesis de Brunner et al. que sostienen que en un sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>” no se puede separar la fase acuosa de la fase alcohólica, en condiciones críticas del gas, debido al punto azeotrópico existente entre el etanol y a agua (ver Figura 4.5).<sup>(50)</sup>

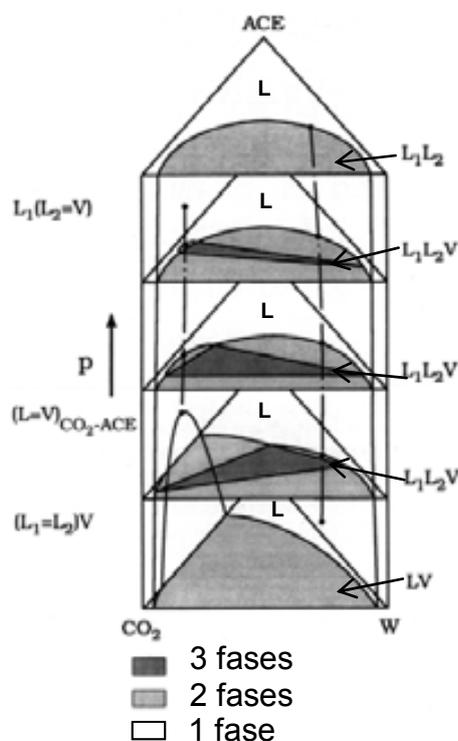


**Figura 4.11.** Esquema de una microemulsión o/w formada a partir del sistema “etanol/agua /CO<sub>2</sub>”, donde  $L_1$  es una fase formada por agua y etanol, y  $L_2$  es una fase orgánica rica en CO<sub>2</sub> líquido.

## 4.2.4 Microemulsiones en sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>”

### 4.2.4.1 Diagrama de fases del sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>”

El sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” fue el segundo sistema que se eligió para estudiar la viabilidad de formar microemulsiones o/w con una fase discontinua constituida por un disolvente expandido con CO<sub>2</sub>. Este sistema cumple con los criterios definidos en el Apartado 4.2.1, ya que la acetona es un disolvente orgánico polar completamente miscible con el agua a temperatura ambiente y a presión atmosférica y además presenta una miscibilidad total con el CO<sub>2</sub> a  $P > 8\text{MPa}$  a la temperatura de 298K.<sup>(43)</sup> En la Figura 4.12 se encuentra representado el comportamiento de fases cualitativo del sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” calculado por Wendland et al. a temperatura constante y en el rango de presiones comprendido entre 2-10MPa.<sup>(44)</sup> Como es habitual, este comportamiento esta representado mediante un prisma, constituido por la superposición de diagramas de fases triangulares a valores constantes de presión, en los que el valor de la presión aumenta de abajo a arriba. La nomenclatura utilizada para describir este tipo de diagramas se recoge en la Tabla 4.4.



**Figura 4.12.** Esquema del diagrama de fases del sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” a 313K en el rango de presiones comprendido entre 2-10 MPa.<sup>(34),(44)</sup>

**Tabla 4.4.** Nomenclatura utilizada en los diagramas de fases del sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>”.

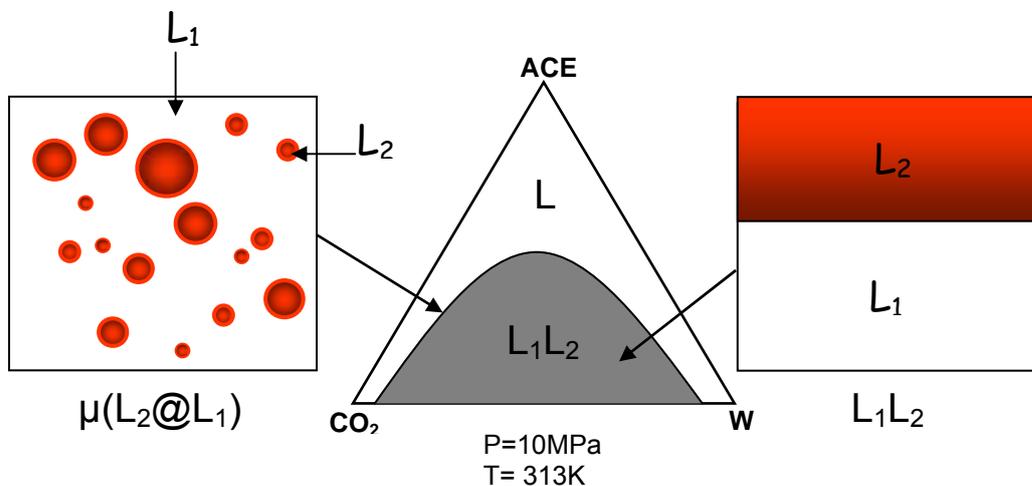
|                 |                    |   |                 |
|-----------------|--------------------|---|-----------------|
| ACE             | Acetona            | P | Presión         |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono | T | Temperatura     |
| W               | Agua               | x | Fracción molar  |
| V               | Fase vapor         | 1 | Fase 1 acuosa   |
| L               | Fase líquida       | 2 | Fase 2 orgánica |

Tal y como se puede observar en la Figura 4.12, a bajas presiones, la región bifásica líquido-vapor LV se extiende desde el eje binario del dióxido de carbono-agua hasta el lado correspondiente al dióxido de carbono-acetona. A estas condiciones la acetona y el agua son completamente miscibles y se comportan como un único líquido. Conforme aumenta la presión, en la zona central del prisma, se puede observar la aparición de una región trifásica líquido-líquido-vapor L<sub>1</sub>L<sub>2</sub>V. El rango de existencia de dicha región trifásica va disminuyendo conforme se va incrementado la presión del sistema, mientras que la región bifásica en la que coexisten dos fases líquidas, L<sub>1</sub>L<sub>2</sub> va incrementado progresivamente. La cantidad de CO<sub>2</sub> presente en la fase rica en agua, L<sub>1</sub>, y en la fase rica en acetona, L<sub>2</sub>, es muy distinta puesto que la afinidad del CO<sub>2</sub> por la acetona es muy superior a la de éste por el agua.

Desde un punto de vista experimental, para poder formar microemulsiones  $\mu(L_2@L_1)$  en las que la fase discontinua sea acetona expandida con CO<sub>2</sub> (L<sub>2</sub>) y la fase continua sea la acuosa (L<sub>1</sub>), hemos de evitar trabajar a aquellas condiciones de presión, temperatura y composición, en las que el sistema se encuentre en un equilibrio de fases con una fase vapor V (L<sub>1</sub>V, L<sub>2</sub>V o L<sub>1</sub>L<sub>2</sub>V).<sup>(34)</sup> Por este motivo, en la presente Tesis Doctoral se analizó la capacidad del sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” para organizarse como una microemulsión a  $P_w \geq 8\text{MPa}$ . A estas condiciones de presión, tal y como se observa en los gráficos de las Figuras 4.12 y 4.13, el sistema puede encontrarse o bien constituido por una sola fase L o bien por dos fases líquidas L<sub>1</sub>L<sub>2</sub>, donde L<sub>1</sub> es una fase o dominio rico en agua, y L<sub>2</sub> lo es en acetona.

Así pues, tal y como se describe en detalle en el siguiente apartado, en este trabajo se ha estudiado la viabilidad de formar microemulsiones en base al sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>”, explorando la variación de la estructura a nivel sub-microscópico al someterlo a cambios de presión y composición, en algunos puntos de la interfase entre la región bifásica L<sub>1</sub>L<sub>2</sub> y la monofásica L. En concreto, se analizó con detalle si bajo ciertas condiciones, en la transición desde una sola fase L a dos fases L<sub>1</sub>L<sub>2</sub>, el

sistema forma emulsiones  $L_2@L_1$  o microemulsiones  $\mu(L_2@L_1)$  termodinámicamente estables, en las que dominios nanoscópicos de la fase  $L_2$  se encuentran dispersos en el medio continuo  $L_1$  (ver Figura 4.13).



**Figura 4.13.** Esquema cualitativo del diagrama de fases del sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” a presión y temperatura constante.<sup>(44)</sup>

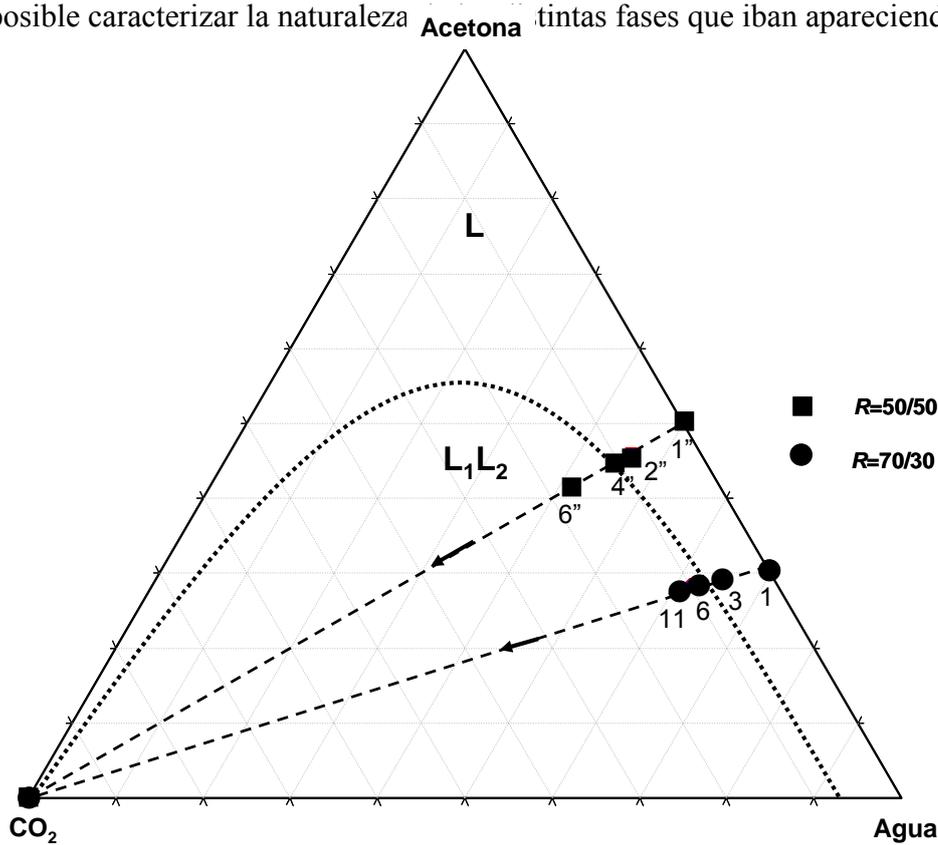
#### 4.2.4.2 Preparación de microemulsiones o/w en sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>”

En esta sección se describe el estudio, mediante inspección visual y por densidad óptica, de los cambios experimentados por el sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” en algunos puntos de la interfase entre la zona bifásica  $L_1L_2$  y la zona monofásica  $L$ , al someterlos a variaciones de presión y de contenido en CO<sub>2</sub>.

Para poder facilitar el análisis del sistema por inspección visual, también se emplearon los colorantes acridina y “solvent blue 35” (ver Figura 4.8) de distinto color y que presentan solubilidades diferentes en agua y en acetona, y por ello permiten detectar la naturaleza de las fases líquidas que se forman. La acridina es de color amarillo y soluble en acetona y agua, mientras que el “solvent blue 35” es de color azul, soluble en acetona, e insoluble en agua. Ambos colorantes son insolubles en CO<sub>2</sub> líquido. En todos los experimentos que se realizaron se introdujeron en la celda de medida 0,5mg de ambos colorantes disueltos en la fase orgánica, y se empleó la configuración experimental y el protocolo operacional descritos en el Apartado 4.2.2.

Tal y como se representa en la Figura 4.14, en primer lugar se estudió la evolución de los sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” con una relación molar entre agua y

acetona ( $R$ ) de 70/30 y 50/50, a 10MPa y 308K, al variar la fracción molar de  $CO_2$ ,  $X_{CO_2}$ . Así, sobre mezclas de acetona/agua con ( $R$ )=70/30 y 50/50, la cuales forman una sola fase líquida  $L$ , se añadió  $CO_2$  siguiendo las líneas de trabajo, esquematizadas en la Figura 4.14, hasta que se produjo la separación del sistema en dos fases líquidas  $L_1$  y  $L_2$ . Este proceso se siguió mediante inspección visual, a través de la mirilla de la celda de volumen variable, identificando aquellos valores de  $X_{CO_2}$  en los que se producen cambios en el sistema (ver Tabla 4.5). Gracias a la presencia de colorantes en el sistema, fue posible caracterizar la naturaleza



**Figura 4.14.** Diagrama de fases cualitativo del sistema “acetona/agua/ $CO_2$ ”. Líneas de trabajo (---) que muestran la evolución de un sistema con  $R=50/50$  (■) y  $R=70/30$  (●) a 308K y 10MPa al variar el contenido en  $CO_2$ . Los números indican el punto de la Tabla 4.5 al que corresponde cada señal.

Tal y como muestran las imágenes de la Figura 4.15 y los datos recogidos en la Tabla 4.5, también se estudió la evolución de algunos sistemas, representados por puntos en la Figura 4.14, al variar la presión desde 8 hasta 14MPa. Los puntos a presiones de 8, 12 y 13MPa se representan en la Tabla 4.5 con números en cursiva, mientras que los puntos a una presión de 14MPa se dan en negrita.

**Tabla 4.5.** Análisis de fases de los sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” con  $R=70/30$  y  $R=50/50$  a la temperatura de 308K y al someterlos a cambios de presión y contenido en CO<sub>2</sub> conteniendo los colorantes A y B.

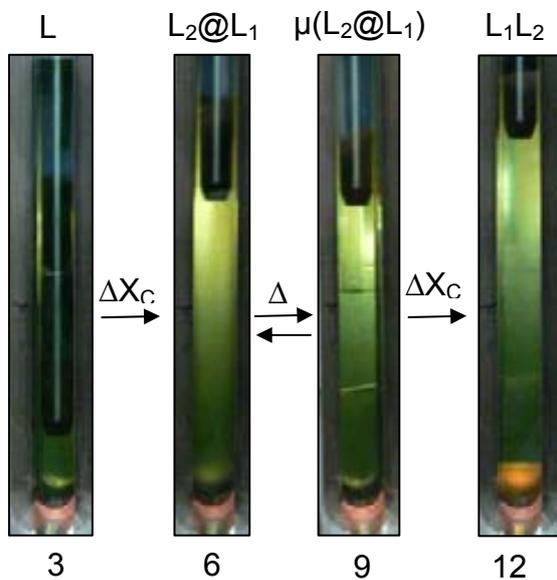
|                 | Punto | P(MPa) <sup>a</sup> | X <sub>CO<sub>2</sub></sub> <sup>b</sup> | Inspección visual | Color            | O.D. <sup>c</sup> | Fases <sup>d</sup>              |
|-----------------|-------|---------------------|--|-------------------|------------------|-------------------|---------------------------------|
| $R=70/30^\circ$ | 1     | 10                  | 0  | Transparente      | Verde            | 0                 | L                               |
|                 | 2     | 8                   | 0,17                                     | Transparente      | Verde            | 0                 | L                               |
|                 | 3     | 10                  | 0,17                                     | Transparente      | Verde            | 0                 | L                               |
|                 | 4     | 14                  | 0,17                                     | Transparente      | Verde            | 0                 | L                               |
|                 | 5     | 8                   | 0,26                                     | Turbio            | Verde            | 2                 | L <sub>2</sub> @L <sub>1</sub>  |
|                 | 6     | 10                  | 0,26                                     | Turbio            | Verde            | ≈1,8              | L <sub>2</sub> @L <sub>1</sub>  |
|                 | 7     | 12                  | 0,26                                     | Turbio            | Verde            | 1,4               | L <sub>2</sub> @L <sub>1</sub>  |
|                 | 8     | 13                  | 0,26                                     | Transparente      | Verde            | 0,4               | μL <sub>2</sub> @L <sub>1</sub> |
|                 | 9     | 14                  | 0,26                                     | Transparente      | Verde            | 0,1               | μL <sub>2</sub> @L <sub>1</sub> |
|                 | 10    | 8                   | 0,30                                     | Separación        | Verde + Amarillo | 2,2               | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub>   |
|                 | 11    | 10                  | 0,30                                     | Separación        | Verde + Amarillo | 2,2               | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub>   |
|                 | 12    | 14                  | 0,30                                     | Separación        | Verde + Amarillo | 2                 | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub>   |
| $R=50/50^\circ$ | 1''   | 10                  | 0  | Transparente      | Verde            | -                 | L                               |
|                 | 2''   | 10                  | 0,15                                     | Transparente      | Verde            | -                 | L                               |
|                 | 3''   | 14                  | 0,15                                     | Transparente      | Verde            | -                 | L                               |
|                 | 4''   | 10                  | 0,19                                     | Turbio            | Verde            | -                 | L <sub>2</sub> @L <sub>1</sub>  |
|                 | 5''   | 14                  | 0,19                                     | Transparente      | Verde            | -                 | μL <sub>2</sub> @L <sub>1</sub> |
|                 | 6''   | 10                  | 0,30                                     | Separación        | Verde + Amarillo | -                 | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub>   |
|                 | 7''   | 14                  | 0,30                                     | Separación        | Verde + Amarillo | -                 | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub>   |

[a] Presión del sistema. [b] X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=moles CO<sub>2</sub>/(molesCO<sub>2</sub>+moles acetona). [c] Densidad óptica. [d] Fases observadas en el sistema: L, una sola fase líquida rica en acetona y agua; L<sub>2</sub>@L<sub>1</sub>, emulsión; μL<sub>2</sub>@L<sub>1</sub>, microemulsión; L<sub>1</sub>L<sub>2</sub>, dos fases líquidas separadas. [e] Relación molar agua/acetona.

Los resultados de la Tabla 4.5 muestran que el sistema “acetona/agua” con una relación molar inicial de agua/acetona de 70/30 y X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=0 (Punto 1 – Tabla 4.5), está formado por una sola fase líquida L, que es de color verde debido a la presencia simultánea de los colorantes acridina y “solvent blue 35”. Este punto está representado por un símbolo ● sobre el eje acetona-agua del diagrama de fases de la Figura 4.14. Al adicionar CO<sub>2</sub> hasta un valor de X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=0,17 y 10MPa (Punto 3- Tabla 4.5 y Figura 4.15), se observa que el sistema sigue formado por una sola fase líquida verde L, la cual podría ser bien una disolución líquida L ó una microemulsión μ(L<sub>2</sub>@L<sub>1</sub>) estable termodinámicamente. A estas condiciones, se comprobó que un aumento de la presión del sistema hasta un valor de 14MPa (Punto 4 - Tabla 4.5), no tenía prácticamente ninguna repercusión aparente sobre la composición de las fases del sistema, manteniéndose el sistema en una sola fase líquida. Al continuar adicionando CO<sub>2</sub> hasta un valor de X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=0,26, manteniendo la presión a 10MPa (Punto 6 – Tabla 4.5), se observa que el aspecto del sistema pasa a ser turbio (ver Figura 4.15), debido a la separación del sistema en dos fases líquidas, L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>, que forman una emulsión L<sub>2</sub>@L<sub>1</sub>, que se mantiene estable durante varias horas. En este punto, si se incrementa la presión de 10 a 14MPa (Punto 9- Tabla 4.5), el sistema pasa de nuevo de turbio a transparente,

observándose la presencia de una sola fase líquida de color verde (Figura 4.15). La desaparición de la turbidez que experimenta el sistema correspondiente al Punto 6 de la Tabla 4.5 al aumentar la presión, indica que el sistema pasa de estar formado por dos fases a estarlo por una única fase, la cual podría ser una disolución líquida L ó bien una microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$  estable termodinámicamente.

Si sobre el sistema representando en el Punto 6 se sigue adicionando más CO<sub>2</sub>, llega un momento a  $X_{CO_2}=0,30$  en el cual se produce una separación total de las fases, y el sistema se escinde o se rompe inmediatamente en dos fases líquidas L<sub>1</sub>L<sub>2</sub> con distinta composición, separadas por una sola interfase (Punto 11- Tabla 4.5 y Figura 4.15). La fase más densa, que se observa en la parte inferior de la celda, es rica en agua, L<sub>1</sub>, tal y como se deduce de su coloración amarilla, causada por la presencia del colorante acridina y la ausencia del colorante “solvent blue 35” insoluble en agua y soluble en acetona. En cambio, la fase menos densa en la parte superior de la celda, tiene una coloración verde debido a la presencia de ambos colorantes, lo que indica que es una fase líquida, L<sub>2</sub>, rica en acetona y CO<sub>2</sub>.

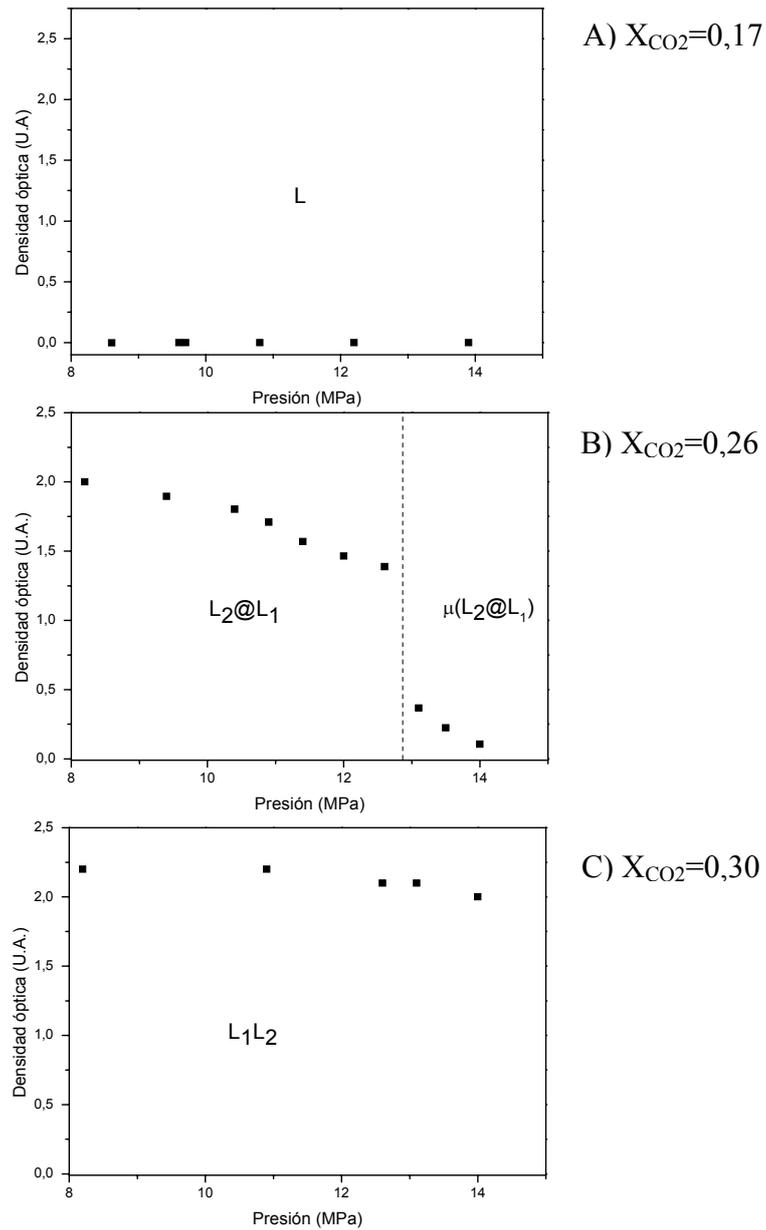


**Figura 4.15.** Imágenes de la evolución del sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” con  $R=70/30$  al variar la presión y el contenido en CO<sub>2</sub>. La transición entre los puntos 3→6 es debida al incremento de  $X_{CO_2}$ , 6→9 a un incremento de presión y entre 9→12 a un nuevo incremento en la  $X_{CO_2}$  (ver Tabla 4.5).

Además de seguir mediante inspección visual, la evolución de la composición de fases del sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” con  $(R)=70/30$  al variar su contenido en CO<sub>2</sub> y la presión, este proceso de transformación también se siguió mediante la medida de su densidad óptica ( $OD_\lambda$ ), para caracterizar mejor las variaciones estructurales a nivel microscópico y nanoscópico (ver Apartado 4.2.2).

El procedimiento que se ha seguido en el presente trabajo para la medición de esa magnitud se encuentra descrito en la Parte Experimental. En el caso del sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>”, la densidad óptica se calculó a partir de la medida de la absorbancia del sistema a  $\lambda=500\text{nm}$ , en la cual dicho sistema no absorbe, empleando una celda óptica con un camino de 1cm, y utilizando un espectrofotómetro de ultravioleta-visible conectado a dicha celda mediante fibra óptica (ver Figura 4.3, Apartado 4.2.2). En la Figura 4.16 se muestran las variaciones de la densidad óptica que sufren tres sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” distintos, con la misma relación molar de agua/acetona ( $R=70/30$ ) y diferente  $X_{\text{CO}_2}$ , al variar la presión.

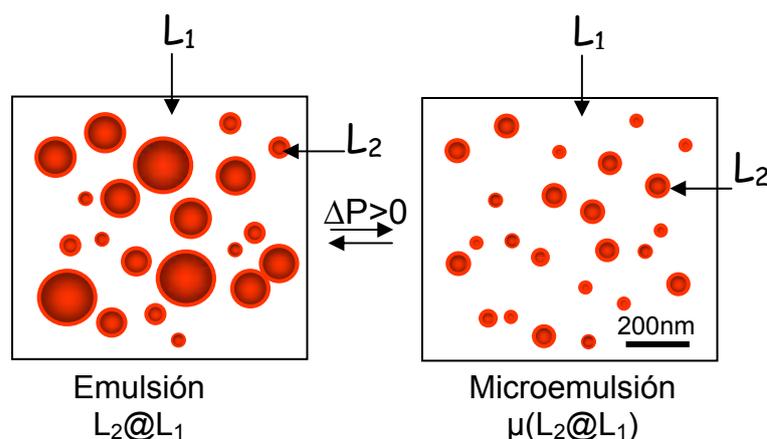
Así, al variar la presión sobre el sistema con  $X_{\text{CO}_2}=0,17$  (ver Figura 4.16A), se observa que en todo el rango de presiones que va desde 8MPa (Punto 2 – Tabla 4.3) hasta 14MPa (Punto 4 – Tabla 4.5) el valor de la  $OD_\lambda$  se mantiene constante e igual a cero, indicando que en este rango de presiones el sistema es totalmente transparente y está formado por una sola fase L, la cual no está estructurada a nivel nanoscópico. Ahora bien, al variar la presión sobre el sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” con un contenido en CO<sub>2</sub> de  $X_{\text{CO}_2}=0,26$  (ver Figura 4.16B), se observa que el valor de la densidad óptica va disminuyendo paulatinamente al aumentar la presión, desde 2 en 8MPa a 1,4 en 12MPa. Los valores de  $OD_\lambda > 1$  para este rango de presiones son debidos a que en estas condiciones el sistema se encuentra constituido por dos fases líquidas en forma de emulsión  $L_2@L_1$ , tal y como se observa por inspección visual (ver Tabla 4.5). En la gráfica de la Figura 4.9B se observa que al aumentar la presión de este sistema desde 12 a 13MPa, la  $OD_\lambda$  sufre un descenso abrupto desde 1,4 a 0,4, coincidiendo con un cambio en el aspecto visual del sistema de turbio a transparente. El hecho de que a 13MPa el valor de la  $OD_\lambda$  para este sistema constituido por una sola fase visualmente transparente sea superior a cero, indica que este sistema posee una cierta estructura a nivel nanoscópico probablemente formando una microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$ .<sup>(3)</sup> Al seguir aumentando la presión desde 13 a 14MPa, se observa una disminución de la  $OD_\lambda$  indicando una disminución progresiva en las dimensiones de los dominios dispersos. A través de la  $OD_\lambda$  y por inspección visual se ha comprobado que dicha microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$  es estable con el tiempo, y que su formación y destrucción es reversible mediante variaciones de presión. Esta reversibilidad se ha comprobado sometiendo al sistema a variaciones de presión de 8 a 14 MPa y de 14 a 8MP, diez veces.



**Figura 4.16.** Evolución de la densidad óptica ( $OD_\lambda$ ) a  $\lambda=500\text{nm}$ , con la variación de la presión en sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” con  $R=70/30$  y distinto contenido en CO<sub>2</sub>: (A)  $X_{CO_2}=0,17$ , (B)  $X_{CO_2}=0,26$ , y (C)  $X_{CO_2}=0,30$ ,

Finalmente, al variar la presión sobre el sistema con  $X_{CO_2}=0,30$  (ver Figura 4.16C), se observa que en todo el rango de presiones que va desde 8MPa (Punto 10 – Tabla 4.3) hasta 14MPa (Punto 12 – Tabla 4.5) el valor de la  $OD_\lambda$  se mantiene por encima de 2. Los valores de  $OD_\lambda > 2$  para este rango de presiones son debidos a que en estas condiciones el sistema se encuentra constituido por dos fases líquidas totalmente escindidas ( $L_1L_2$ ), tal y como se observa por inspección visual (ver Tabla 4.5 y Figura 4.15).

El estudio anterior también se hizo con la misma mezcla de agua/acetona pero con una relación molar de agua/acetona de 50/50 (ver Tabla 4.5). Los resultados obtenidos fueron muy similares a los obtenidos cuando se emplea una relación molar de 70/30. Concretamente, a  $R=50/50$  se observa que las microemulsiones  $\mu(L_2@L_1)$  se forman a una fracción molar de  $\text{CO}_2$  inferior a la observada para una relación de agua/acetona de 70/30. Asimismo, se observó que la fracción molar de  $\text{CO}_2$  a partir de la cual el sistema se escinde completamente en dos fases inmiscibles es la misma para ambas proporciones agua/acetona.



**Figura 4.17.** Cambio en la composición de fases del sistema “acetona/agua/ $\text{CO}_2$ ” cuando se varía la presión del sistema.  $L_1$ , fase rica en agua y  $L_2$ , fase rica en acetona expandida con  $\text{CO}_2$ .

Los resultados anteriores muestran que la adición de  $\text{CO}_2$  sobre un sistema “acetona/agua” de una sola fase, y a diferencia con lo observado en el sistema “etanol/agua/ $\text{CO}_2$ ”, puede llevar bajo ciertas condiciones de presión y temperatura a la formación de una microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$ , en la que nanodominios de acetona expandida con  $\text{CO}_2$  se encuentran dispersos en una fase acuosa. Este diferente comportamiento se explica por la mayor afinidad que este disolvente tiene, en comparación con el etanol, por el  $\text{CO}_2$ .<sup>(54)</sup> También se ha observado que la formación y destrucción de estas microemulsiones puede realizarse de forma totalmente reversible por cambios de presión (ver Figura 4.17).

#### 4.2.5 Influencia del uso de tensoactivos en las microemulsiones basadas en sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>”

Tal y como se ha descrito en el apartado anterior, el sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” es capaz de formar microemulsiones o/w, en la que nanodominios de acetona expandida con CO<sub>2</sub> se encuentran dispersos en una fase acuosa. Estas microemulsiones pueden formarse y destruirse de manera reversible por cambios de presión.

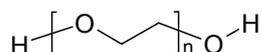
En este apartado se describen los experimentos y estudios realizados en sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” en presencia de tensoactivos, para determinar su influencia en la estabilidad de las microemulsiones que pueden formarse con estos sistemas, al someterlos a variaciones de X<sub>CO<sub>2</sub></sub> o de presión. Para realizar este estudio se seleccionó un tensoactivo o emulsionante que fuera soluble en los tres componentes del sistema, y que además fuese capaz de estabilizar la emulsión de tipo o/w. Dicha selección se llevó a cabo de acuerdo al método del balance hidrofílico-hidrofóbico (HLB), establecido por Griffin.<sup>(55)</sup> Dicho método emplea el índice HLB que describe la relación entre el carácter hidrofílico e hidrofóbico de un compuesto, el cual puede tomar valores comprendidos entre 0 y 20. Este índice sirve para dar una idea cualitativa de cuan soluble es el tensoactivo en la fase acuosa y en la fase oleica. Así, valores del índice HLB comprendidos entre 0-9 suelen corresponder a compuestos hidrofóbicos solubles en aceites, mientras que valores comprendidos entre 11-20 son propios de compuestos solubles en agua e insolubles en fases oleosas. Además, el valor del índice HLB de un compuesto da una idea de sus posibles aplicaciones y del tipo de sistemas que puede formar (ver Tabla 4.6).

**Tabla 4.6.** Valores del índice HLB adecuados para la formación de diferentes sistemas dispersos.<sup>(56)</sup>

| Índice HLB | Aplicación       |
|------------|------------------|
| 3-8        | Emulsionante w/o |
| 7-9        | Agente de mojado |
| 8-18       | Emulsionante o/w |
| 11-15      | Detergente       |
| 12-18      | Solubilizante    |

Como puede verse, sólo aquellos tensoactivos con índices HLB que oscilen entre 3 y 8 serán adecuados para la preparación de emulsiones w/o, mientras que los que

presentan índices que oscilan entre 8 y 18 serán adecuados para la preparación de emulsiones o/w. Como posibles tensoactivos del sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” se seleccionó a la familia de los polietilenglicoles (PEGs) de bajo peso molecular, ya que estos son solubles en agua y en acetona, y también lo son en CO<sub>2</sub>.<sup>(57)</sup> Dentro de esta familia de tensoactivos, se seleccionó el polietilenglicol 6000, más conocido como PEG6000, ya que éste presenta un índice de HLB de 18, lo que lo convierte en un tensoactivo ideal para la formación de emulsiones o/w con el sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” (ver Tabla 4.6). Asimismo, el PEG6000 es un tensoactivo relativamente barato y de baja toxicidad, en comparación con otros tensoactivos de tipo fluorados y derivados de siloxanos que normalmente son utilizados en combinación con CO<sub>2</sub> a alta presión.<sup>(58)</sup>



**Figura 4.18.** Fórmula molecular de los polietilenglicoles (PEGs).

En esta sección se describe el estudio, mediante inspección visual y por densidad óptica, de los cambios experimentados por el sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” en presencia de PEG6000 en algunos puntos de la interfase entre la zona bifásica L<sub>1</sub>L<sub>2</sub> y la zona monofásica L de este sistema, al someterlos a variaciones de presión y de contenido en CO<sub>2</sub> (ver Figura 4.13). Los sistemas estudiados en presencia de PEG6000 fueron los mismos que en su ausencia (ver Apartado 4.2.4)

En primer lugar, se estudió la evolución de los sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” en presencia de PEG6000 con una relación molar entre agua y acetona (*R*) de 70/30 y 50/50, a 10MPa y 308K, al variar la fracción molar de CO<sub>2</sub>, X<sub>CO<sub>2</sub></sub>. Así, sobre disoluciones de acetona/agua con (*R*) =70/30 y 50/50, en presencia de PEG6000 con una concentración de 1,61M, se añadió CO<sub>2</sub> hasta que se produjo la separación del sistema en dos fases líquidas L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>. Este proceso se siguió mediante inspección visual, a través de la mirilla de la celda de volumen variable, identificando aquellos valores de X<sub>CO<sub>2</sub></sub> en los que se producían cambios en el sistema (ver Tabla 4.7). Gracias a la presencia de los colorantes “acridina y solvent blue 35” en el sistema, fue posible caracterizar la naturaleza de las distintas fases que iban apareciendo. En todos los experimentos se empleó la configuración experimental y el protocolo operacional descritos en el Apartado 4.2.2.

Los resultados de la Tabla 4.7 muestran que el sistema “acetona/agua” con una relación molar de agua/acetona inicial de 70/30 y  $X_{CO_2}=0$  (Punto 1 – Tabla 4.7), está formado por una única fase líquida, L, en la cual se encuentra disuelto el PEG6000. La formación de esta fase líquida de color verde, debido a la presencia simultánea de la acridina y del “solvent blue 35”, indica que está formada por una mezcla de acetona y agua.

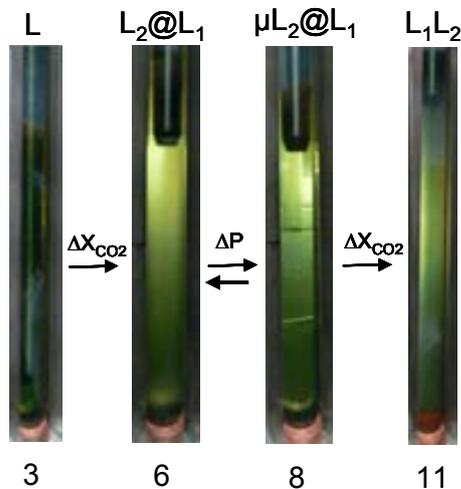
Al adicionar CO<sub>2</sub> hasta un valor de  $X_{CO_2}=0,23$  y 10MPa (Punto 3- Tabla 4.7 y Figura 4.19), se puede observar que el sistema sigue formado por una sola fase líquida verde L, la cual podría ser bien una disolución líquida L o bien una microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$  estable termodinámicamente. A estas condiciones, se comprobó que un aumento de la presión del sistema hasta 14MPa (Punto 4 - Tabla 4.7), no tenía practicante ninguna repercusión aparente sobre la composición de fases del sistema, manteniéndose el sistema en una sola fase líquida. Al continuar adicionando CO<sub>2</sub> hasta un valor de  $X_{CO_2}=0,28$ , manteniendo la presión a 10MPa (Punto 6 – Tabla 4.7), se observa, tal y como se observó para el mismo sistema en ausencia de PEG6000, que el aspecto del sistema pasa a ser turbio (ver Figura 4.19), debido a la formación de una emulsión  $L_2@L_1$ , la cual se mantiene estable durante varias horas. En este punto, si se incrementa la presión de 10 a 11,3MPa (Punto 8- Tabla 4.7), el sistema pasa de turbio a transparente, observándose la presencia de una sola fase líquida de color verde (Figura 4.19). La desaparición de la turbidez que experimenta el sistema correspondiente al Punto 6 de la Tabla 4.8 al aumentar la presión, indica que el sistema pasa de estar formado por una emulsión a estarlo por una única fase, la cual podría ser bien una disolución líquida L o bien una microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$  estable termodinámicamente.

Si sobre el sistema representando en el Punto 6 se sigue adicionando más CO<sub>2</sub>, llega un momento a  $X_{CO_2}=0,32$  en el cual se produce una separación total de las fases, y el sistema se escinde o se rompe inmediatamente en dos fases líquidas,  $L_1L_2$ , con distinta composición, separadas por una sola interfase (Punto 10- Tabla 4.7 y Punto 11 - Figura 4.19). La fase más densa, que se observa en la parte inferior de la celda, es de coloración amarillenta, causada por la presencia del colorante acridina y la ausencia del colorante “solvent blue 35”, lo que indica su naturaleza acuosa,  $L_1$ . En cambio, la fase menos densa en la parte superior de la celda, tiene una coloración verde debido a la presencia de ambos colorantes, lo que indica que es una fase líquida rica en acetona y CO<sub>2</sub>,  $L_2$ . Cabe destacar aquí, que en ningún momento al aumentar el contenido en CO<sub>2</sub> del sistema se observó la precipitación del tensoactivo empleado.

**Tabla 4.7.** Análisis de fases de los sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” en presencia de PEG6000 con  $R=70/30$  y  $R=50/50$  a la temperatura de 308K y al someterlos a cambios de presión y contenido en CO<sub>2</sub> en presencia de los colorantes A y B.

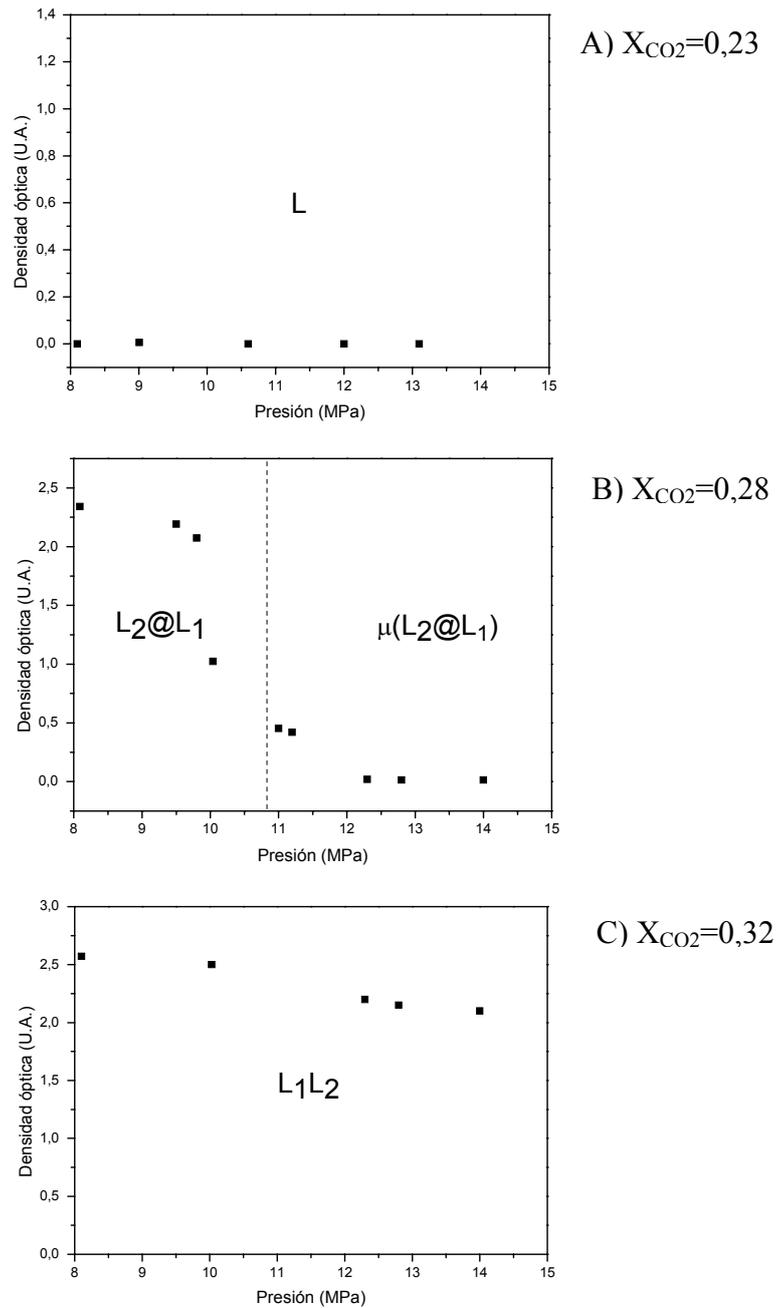
|                 | Punto | P(MPa) <sup>a</sup> | X <sub>CO<sub>2</sub></sub> <sup>b</sup> | Inspección visual | Color            | O.D. <sup>c</sup> | Fases <sup>d</sup>                   |
|-----------------|-------|---------------------|--|-------------------|------------------|-------------------|--------------------------------------|
| $R=70/30^\circ$ | 1     | 10                  | 0  | Transparente      | Verde            | 0                 | L                                    |
|                 | 2     | 8                   | 0,23                                     | Transparente      | Verde            | 0                 | L                                    |
|                 | 3     | 10                  | 0,23                                     | Transparente      | Verde            | 0                 | L                                    |
|                 | 4     | 14                  | 0,23                                     | Transparente      | Verde            | 0                 | L                                    |
|                 | 5     | 8                   | 0,28                                     | Turbio            | Verde            | 2,3               | L <sub>2</sub> @L <sub>1</sub>       |
|                 | 6     | 10                  | 0,28                                     | Turbio            | Verde            | 1,1               | L <sub>2</sub> @L <sub>1</sub>       |
|                 | 7     | 11.3                | 0,28                                     | Transparente      | Verde            | 0,4               | $\mu$ L <sub>2</sub> @L <sub>1</sub> |
|                 | 8     | 14                  | 0,28                                     | Transparente      | Verde            | 0,1               | $\mu$ L <sub>2</sub> @L <sub>1</sub> |
|                 | 9     | 8                   | 0,32                                     | Separación        | Verde + Amarillo | 2,55              | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub>        |
|                 | 10    | 10                  | 0,32                                     | Separación        | Verde + Amarillo | 2,5               | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub>        |
|                 | 11    | 14                  | 0,32                                     | Separación        | Verde + Amarillo | 2,1               | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub>        |
| $R=50/50^\circ$ | 1''   | 10                  | 0  | Transparente      | Verde            | -                 | L                                    |
|                 | 2''   | 10                  | 0,21                                     | Transparente      | Verde            | -                 | L                                    |
|                 | 3''   | 14                  | 0,21                                     | Transparente      | Verde            | -                 | L                                    |
|                 | 4''   | 10                  | 0,23                                     | Turbio            | Verde            | -                 | L <sub>2</sub> @L <sub>1</sub>       |
|                 | 5''   | 14                  | 0,23                                     | Transparente      | Verde            | -                 | $\mu$ L <sub>2</sub> @L <sub>1</sub> |
|                 | 6''   | 10                  | 0,42                                     | Separación        | Verde + Amarillo | -                 | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub>        |
|                 | 7''   | 14                  | 0,42                                     | Separación        | Verde + Amarillo | -                 | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub>        |

[a] Presión del sistema. [b] X<sub>CO<sub>2</sub></sub>= moles CO<sub>2</sub>/(moles CO<sub>2</sub> + moles acetona). [c] Densidad óptica. [d] Fases observadas en el sistema: L, una sola fase líquida; L<sub>2</sub>@L<sub>1</sub>, emulsión;  $\mu$ L<sub>2</sub>@L<sub>1</sub>, microemulsión; L<sub>1</sub>L<sub>2</sub>, dos fases líquidas separadas. [e] Relación molar agua/acetona. [f] Concentración de PEG6000=1,61M.



**Figura 4.19.** Imágenes de la evolución del sistema “PEG6000/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” con una relación molar de  $R=70/30$  al variar la presión y el contenido en CO<sub>2</sub>. La transición entre los puntos 3→6 es debida al incremento de X<sub>CO<sub>2</sub></sub>, 6→8 a un incremento de presión y entre 8→11 a un nuevo incremento en la X<sub>CO<sub>2</sub></sub> (ver Tabla 4.7).

Además de seguir mediante inspección visual, la evolución de la composición de fases del sistema “PEG6000/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” con  $R=70/30$  al variar su contenido en CO<sub>2</sub> y la presión, este proceso de transformación también se han caracterizado mediante la medida de su densidad óptica ( $OD_\lambda$ ), ya que esto permite una mejor caracterización de la estructura de las fases generadas a nivel microscópico y nanoscópico (ver Apartado 4.2.2).<sup>(36)(37)</sup>



**Figura 4.20.** Evolución de la densidad óptica ( $OD_\lambda$ ) a  $\lambda=500\text{nm}$ , con la variación de la presión en sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” con  $R=70/30$  y distinto contenido en CO<sub>2</sub> en presencia de PEG6000: (A)  $X_{CO_2}=0,23$ , (B)  $X_{CO_2}=0,28$ , y (C)  $X_{CO_2}=0,32$ .

El estudio por densidad óptica del sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” en presencia de PEG6000, se realizó a partir de la medida de la absorbancia de estos sistemas a  $\lambda=500\text{nm}$ , en la cual dicho sistema no absorbe, empleando una celda óptica con un camino de 1cm, y utilizando un espectrofotómetro de ultravioleta-visible incorporado al analizador de fases (ver Figura 4.3, Apartado 4.2.2). En la Figura 4.20 se muestran las variaciones de la densidad óptica que sufren tres sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” distintos

con  $R=70/30$  y diferentes  $X_{CO_2}$ , en presencia de PEG6000, al variar la presión. Así al variar la presión sobre el sistema con  $X_{CO_2}=0,23$  (ver Figura 4.20A), se observa que en todo el rango de presiones que va desde 8MPa (Punto 2 – Tabla 4.7) hasta 14MPa (Punto 4 – Tabla 4.7) el valor de la  $OD_\lambda$  se mantiene constante e igual a cero, indicando que en este rango de presiones el sistema está formado por una sola fase L, la cual no está estructurada a nivel nanoscópico. Ahora bien, al variar la presión sobre el sistema “acetona/agua/ $CO_2$ ” en presencia de PEG6000 con un contenido en  $CO_2$  superior de  $X_{CO_2}=0,28$  (ver Figura 4.20B), se observa que el valor de la densidad óptica va disminuyendo paulatinamente al aumentar la presión, desde 2,3 en 8MPa a 1,1 en 10MPa. Los valores de  $OD_\lambda > 1$  para este rango de presiones son debidos a que en estas condiciones el sistema se encuentra constituido por dos fases líquidas en forma de emulsión  $L_2@L_1$ , tal y como se observa por inspección visual (ver Tabla 4.7 y Punto 6-Figura 4.19). En la gráfica de la Figura 4.20B se observa que al aumentar la presión de este sistema desde 10 a 11,3MPa, la  $OD_\lambda$  sufre un descenso abrupto desde 1,1 a 0,4, coincidiendo con un cambio en el aspecto visual del sistema de turbio a transparente. El hecho de que a 11,3MPa el valor de la  $OD_\lambda$  para este sistema constituido por una sola fase visualmente transparente sea superior a cero, indica que este sistema posee una cierta estructura a nivel nanoscópico formando una microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$ .<sup>(3)</sup> Al seguir aumentando la presión desde 11,3 a 14MPa, se observa una disminución de la  $OD_\lambda$  indicando que se produce una disminución en las dimensiones de los dominios dispersos. A través de la  $OD_\lambda$  y por inspección visual se ha comprobado que dicha microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$  es estable con el tiempo (aproximadamente 24 horas), y que su formación también es reversible, es decir, que se puede destruir mediante una reducción de la presión y volverse a formarse si se incrementa ésta.

Finalmente, el variar la presión sobre el sistema con  $X_{CO_2}=0,32$  (ver Figura 4.20C), se observa que en todo el rango de presiones que va desde 8MPa (Punto 9 – Tabla 4.7) hasta 14MPa (Punto 11 – Tabla 4.7) el valor de la  $OD_\lambda$  se mantiene por encima de 2. Los valores de  $OD_\lambda > 2$  para este rango de presiones son debidos a que en estas condiciones el sistema se encuentra constituido por dos fases líquidas totalmente escindidas,  $L_1L_2$ , tal y como se observa por inspección visual (ver Tabla 4.7 y Punto 11-Figura 4.19).

El estudio anterior también se realizó con mezclas de agua/acetona, con una relación molar de agua/acetona de 50/50 en presencia de PEG6000 (ver Tabla 4.7). Los resultados obtenidos fueron muy similares a los observados cuando se emplea una

relación molar de agua/acetona de 70/30. En este caso, a  $R=50/50$ , las microemulsiones  $\mu(L_2@L_1)$  se forman y escinden en dos fases inmiscibles a una fracción molar de CO<sub>2</sub> inferior y superior, respectivamente, en comparación con aquellas emulsiones preparadas con una relación de agua/acetona de 70/30.

Los resultados anteriores muestran, tal y como se observó en ausencia de PEG6000, que la adición de CO<sub>2</sub> sobre un sistema “acetona/agua” de una sola fase en presencia de PEG6000, puede llevar bajo ciertas condiciones de presión y temperatura a la formación de una microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$ , en la que nanodominios de acetona expandida con CO<sub>2</sub> se encuentran dispersos en una fase acuosa. También se ha observado que la formación y destrucción de estas microemulsiones en presencia del PEG6000 puede realizarse de forma totalmente reversible por cambios de presión y en un rango de composiciones de CO<sub>2</sub> y presiones similares a las observadas sin PEG6000.

### **4.3 Conclusiones**

- ☒ El sistema “etanol/agua/CO<sub>2</sub>” no forma microemulsiones o/w de tipo  $\mu(L_2@L_1)$  en las que  $L_2$  son nanodominios de etanol expandidos con CO<sub>2</sub> dispersos en una fase acuosa,  $L_1$ .
- ☒ El sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” forma, bajo ciertas condiciones de presión, temperatura y composición, microemulsiones o/w de tipo  $\mu(L_2@L_1)$  donde  $L_2$  son nanodominios de acetona expandidos con CO<sub>2</sub> dispersos en una fase acuosa,  $L_1$ .
- ☒ La adición de un tensoactivo de la familia de los polietilenglicoles sobre el sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>”, influye sobre el rango de fracción molar de CO<sub>2</sub> en el cual coexisten las dos fases líquidas  $L_1$  y  $L_2$  que forman la microemulsión de tipo  $\mu(L_2@L_1)$ .

## 4.4 Referencias

- (1) Moulik, S.P.; Paul, B.K. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1998**, 78, 99.
- (2) (a) Becher, P., *Dictionary of colloid and surface science* **1990**, New York, Basel, Marcel Dekker; (b) Becher, P., *Emulsiones: teoría y práctica* **1972**, Madrid, Blume.
- (3) Schwuger, M-J.; Stickdorn, K. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 849.
- (4) Solans, C.; Izquierdo, P.; Nolla, J.; Azemar, N.; Garcia-Celma, M.J. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2005**, 10, 102.
- (5) Kwon, E.; Oikawa, H.; Kasai, H.; Nakanishi, H. *Cryst. Growth Des.* **2007**, 7, 600.
- (6) (a) Sajjadi, S. *Langmuir* **2006**, 22, 5597. (b) Solè. I.; Maestro, A.; González, C.; Solans, C.; Gutiérrez, J.M., *Langmuir* **2006**, 22, 8326. (c) Morales, D.; Solans, C.; Gutiérrez, J.M.; Garcia-Celma, M.J.; Olsson, U., *Langmuir*, **2006**, 22, 3014.
- (7) Shchukin, D.G.; Sukhorukov, G.B. *Adv. Mater.* **2004**, 16, 8, 671.
- (8) López-Quintela, M.A.; Tojo, C.; Blanco, M.J.; García-Río, L.; Leis, J.R. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, 9, 264.
- (9) Willert, M.; Rothe, R.; Landfester, K.; Antonietti, M. *Chem. Mater.* **2001**, 13, 4681.
- (10) Dutta, P.K.; Robbins, D. *Langmuir* **1991**, 7, 1048.
- (11) Li, M.; Mann, S. *Adv. Funct. Mater.* **2002**, 12, 773.
- (12) Mathew, D.S.; Juang, R-S. *Chem. Eng. J.* **2007**, 129, 51.
- (13) Zhang, J.; Han, B.; Liu, J.; Zhang, X.; Yang, G.; Zhao, H. *J. Supercrit. Fluids* **2004**, 30, 89.
- (14) Garti, N.; Lichtenberg, D.; Silberstein, T. *Colloids Surf., A.* **1997**, 128, 17.
- (15) (a) Sadurní, N; Solans, C.; Azemar, N.; García-Celma, M.J. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, 26, 438. (b) Gopal, k.; Bhogi, B.S., *J. Pharm. Sci. Technol.* **1999**, 53, 168.
- (16) Pan, G.; Shower, M.; Zie, S.; Lu, D.R. *Pharm. Res.* **2003**, 20, 738.
- (17) Bivas-Benita, M.; Oudshoorn, M.; Romejin, S.; van Meijgaarden, K.; Koerten, H.; van der Meulen, H. et al. *J. Control Release* **2004**, 100, 145.
- (18) Ohde, H.; Ohde, M.; Bailey, F.; Kim, H.; Wai, C.M. *Nano Lett.* **2002**, 2, 721.
- (19) Zhang, H.; Liu, J.; Han, B. *J. Supercrit. Fluids* **2001**, 20, 65.
- (20) Pai, R.A.; Humayun, R.; Schulberg, M.T.; Sengupta, A.; Sun, J.N.; Watkins, J.J. *Science* **2004**, 303, 507.

- (21) R.P. DaRocha, P.A. Psathas, E. Klein, K.P. Johnston. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, 239, 24.
- (22) Fernandez, C.A.; Wai, C.M. *Small* **2006**, 2, 1266
- (23) Zhang, J.; Han, B.; Zhang, C.; Li, W.; Feng, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1.
- (24)(a) Pathak, P.; Meziani, M.J.; Desai, T.; Sun, Y.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10842. (b) Meziani, M.J.; Sun, Y.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8015. (c) Meziani, M.J.; Pathak, P.; Beacham, F.; Allard, L.F.; Sun, Y.-P. *J. Supercrit. Fluids* **2005**, 34, 91.
- (25) Lee, C.T.Jr.; Ryoo, W.; Smith, P.G.; Arellano, J.; Mitchell, D.R.; Lagow, R.J.; Webber, S.E.; Johnston, K.P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3181.
- (26) Lee, C.T.Jr.; Psathas, P.A.; Johnston, K.P. *Langmuir* **1999**, 15, 6781.
- (27) Reverchon, E.; Adami, R., *J. Supercritical Fluids* **2006**, 37, 1.
- (28) J.Liu; Y. Ikushima; Z. Shervani, *J. Supercrit. Fluids* **2004**, 32, 97.
- (29)(a) Eastoe, J.; Dupont, A.; Steytler, D.C.; Thorpe, M.; Gurgel, A.; Heenan, R.K., *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, 258, 367. (b) Pai, R.A.; Humayun, R.; Schulberg, M.T.; Sengupta, A.; Sun, J.N.; Watkins, J.J. *Science* **2004**, 303, 507.
- (30) Johnston, K.P.; Harrison, K.L.; Clarke, M.J.; Howdle, S.M.; Heitz, M.P.; Bright, F.V.; Carlier, C., Randolph, T.W. *Science* **1996**, 271, 624.
- (31)(a) Ji, M.; Chen, X.; Wai, C.M.; Fulton, J.L. . *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2631. (b) Eckert, C.A.; Knutson, B.L.; Debenedetti, P.G. *Nature* **1996**, 383, 313. (c) Jessop, P.G.; Subramaniam, B. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 2666.
- (32) Sun, Y.-P.; Atornigijawat, P.; Meziani, M.J. *Langmuir* **2001**, 17, 5707.
- (33)(a) Ventosa, N.; Sala, S.; Torres, J.; Llibre, J.; Veciana, J., *Cryst. Growth Des.* **2001**, 1, 299. (b) Sala, S.; Ventosa, N.; Tassaing, T.; Cano, M.; Danten, Y.; Marcel Besnard, M.; Veciana, J. *ChemPhysChem.* **2005**, 6, 4, 587.
- (34) Elgin, J.C.; Weinstock, J.J., *J. Chem. Eng. Data* **1959**, 4, 3.
- (35) Adrian, T; Freitag, J; Maurer, G.; *Fluid Phase Equilib.* **1999**, 158, 685.
- (36)(a) Wei L.; Zhang, J.; Cheng, S.; Han, B.; Zhang, C.; Feng, X.; Zhao, Y. *Langmuir* **2009**, 25, 196. (b) Cocquyt, J.; Olsson, U.; Olofsson, G.; Meeren, van der P. *Langmuir* **2004**, 20, 3906. (c) Feitosa, E.; Bonassi, N.M.; on Loh, W. *Langmuir*

- 2006**, 22, 4512-4517. (d) Ollivon, M.; Lesieur, S.; Gabrielle-Madelmont, C.; Paternostre, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1508, 34.
- (37) Feitosa, E.; Alves, F.R.; Anna Niemiec, A.; Oliveira, M.E.C.D.R.; Castanheira, E. M. S.; Baptista, A. L. F. *Langmuir* **2006**, 22, 3579-3585.
- (38) Gregorowicz, J; Deloos, T.W.; Arons, J.D.; *J. Chem. Eng. Data* **1993**, 38, 414.
- (39) Gregorowicz, J; Smits, P.J.; Deloos, T.W.; Arons, J.D. *Fluid Phase Equilib.* **1993**, 85, 225.
- (40) Hong, S.P.; Patton, C.L.; Luks, K.D.; *J. Chem. Eng. Data* **1994**, 39, 90
- (41) Peters, C.J.; L.J. Florusse, Hahre, S., Arons, J.D., *Fluid Phase Equilib.* **1995**, 110, 157.
- (42) Adrian, T; Wendland, M.; Hasse, H.; Maurer; *J. Supercrit. Fluids* **1998**, 12, 185.
- (43) Day, C-Y.; Chang, C.J.; Chen, C-Y. *J. Chem. Eng. Data* **1996**, 41, 839.
- (44)(a) Wendland, M.; Hasse, H.; Maurer, G.; *J. Supercrit. Fluids* **1994**, 7, 245. (b) Adrian, T; Wendland, M.; Hasse, H.; Maurer; *J. Supercrit. Fluids* **1998**, 12, 185.
- (45) Budich, M; Brunner, G.; *J. Supercrit. Fluids* **2003**, 25, 45.
- (46) Gilbert, M.L.; Paulaltis, M. E. *J. Chem Eng. Data* **1986**, 31, 296.
- (47) Takishima, S.; Saiki, K.; Arai, K.; Saito, S. *J. Chem. Eng. Jpn.* **1986**, 19, 48
- (48) Yoon, J-H.; Lee, H.; Chung, B.H., *Fluid Phase Equilib.* **1994**, 102, 287.
- (49)(a) Efremova, G.D.; Shvartz, A.V. *J. Phys. Chem.* **1969**, 43, 968. (b) Efremova, G.D.; Shvartz, A.V. *J. Phys. Chem.* **1970**, 44, 614.
- (50) Brunner, G; *Gas Extraction*, Springer **1994**, Berlin.
- (51)(a) Nagahama, K.; Suzuki, J.; Suzuki, T.; *Proc. Int. Symp. Supercrit. Fluids. Societe Francaise de Chimie*, Nice **1988**. (b) Lim, J.S.; Lee, Y.Y.; Chum, H.S., *J. Supercrit. Fluids* **1994**, 7, 219.
- (52)(a) Radosz, M., *Fluid Phase Equilib.* **1986**, 29, 515. (b) Yoon, J-H.; Chung, M.K., Hong, W.H.; Lee, H.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **1993**, 32, 2881.
- (53) Saharay, M.; Balasubramanian S. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 3782.
- (54) Isabel Cabac, M.; Danten, Y.; Tassaing, T.; Longelin, S.; Besnard, M. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, 413, 258
- (55) Heusch, R., Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry **2003**, Wiley-VCH, 11, 665.
- (56)(a) Parvatikar, K.G., *Indian J. Phys.* **1958**, 32, 174. (b) Dismukes, E.B., *J. Phys. Chem.* **1959**, 63, 312.

- (57)(a) Heusch, R., Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry **2003**, Wiley-VCH, 11, 690. (b) Das Atlas HLB system, Atlas chemie GmbH, D-4300 Essen, Goldschmittstr 100, **1968**.
- (58) Yee, G.G.; Fulton, J.L.; Smith, R.D., *Langmuir* **1992** 8, 377.



# Capítulo 5

## Preparación de materiales micro- y nanoparticulados a partir de microemulsiones o/w con disolventes expandidos con CO<sub>2</sub>

### El proceso PIWASP

Las propiedades físicas de los materiales moleculares (eléctricas, ópticas, farmacológicas, mecánicas, etc.) vienen determinadas por su estructura molecular y supramolecular, y en muchos casos también por su estructura micro y/o nanoscópica. En farmacia, la morfología y el tamaño de partícula son características determinantes de la biodisponibilidad, fluidez y biocompatibilidad a nivel celular de materiales con aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, cuanto más regular y más esférica sea la morfología de las partículas mayor será su fluidez en formulaciones de tipo aerosol como las que se utilizan para la administración pulmonar.<sup>(1)</sup> Otro reto importante en el campo farmacéutico es el problema de la baja solubilidad en agua, y por tanto de la baja biodisponibilidad que presentan muchos compuestos moleculares con una elevada actividad terapéutica.<sup>(1)</sup> Entre otras estrategias existentes, la reducción del tamaño de la partícula ha emergido como una opción efectiva y versátil para mejorar la velocidad de disolución de sustancias sólidas poco solubles en agua, y por tanto, facilitar su absorción en sangre.<sup>(3)</sup> Asimismo, se ha comprobado que la formulación de estas sustancias activas terapéuticamente en forma de nanosuspensiones -nanopartículas del fármaco suspendidas en un medio acuoso-,<sup>(4)</sup> permite cargar una mayor cantidad de la sustancia por volumen respecto a las disoluciones, reduciendo por tanto los volúmenes de administración, lo que es crucial para aplicaciones oftalmológicas e intramusculares.<sup>(5)</sup> Por otro lado, las nanosuspensiones también son efectivas para la administración de fármacos por vía intravenosa.<sup>(6)</sup> Sin embargo, la llegada al mercado de todos estas nanomedicinas puede verse truncada sino se desarrollan metodologías eficientes para su preparación, de fácil escalado y respetuosas con el medio ambiente.

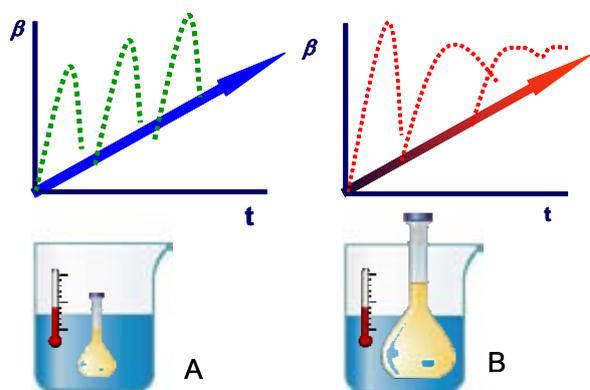
## 5.1 Obtención de sólidos micro y nanoparticulados mediante procesos de precipitación confinados utilizado microemulsiones

Existen básicamente dos estrategias para la preparación de nanopartículas, las denominadas ascendentes (“bottom-up”), y las descendentes (“top-down”). En los procesos que siguen las estrategias ascendentes (procesos de precipitación, emulsión, condensación, o de síntesis específicos), las nanopartículas se preparan a partir de sus unidades constitutivas, las moléculas. En cambio en las estrategias descendentes las dimensiones nanoscópicas del material se alcanzan a partir del material en tamaño macroscópico, mediante métodos de desintegración bien sea por vía seca o por vía húmeda empleando procesos de molienda, homogeneización a alta presión, etc.<sup>(7)</sup> Algunas de las principales desventajas de los métodos de desintegración son el control limitado que se tiene sobre algunas características estructurales del material nanoparticulado final (morfología, propiedades superficiales y carga electrostática) y la ineficiencia del proceso, ya que se necesitan grandes cantidades de energía.<sup>(1)</sup> Asimismo, en muchos casos se ha observado que este tipo de procesos afectan a las propiedades físicas y químicas del material, tales como su carga, tendencia a la aglomeración, reactividad química, cristalinidad y estabilidad físico-química.<sup>(8),(9)</sup>

Dado que las estrategias descendentes presentan numerosos inconvenientes, hoy en día se está haciendo un gran esfuerzo en desarrollar nuevas estrategias ascendentes que permitan la producción directa de nanopartículas con morfologías y organizaciones supramoleculares controladas.<sup>(10)</sup>

En cualquier proceso ascendente de precipitación desde una disolución, las características de las partículas (morfología, tamaño y organización supramolecular) vienen determinadas por la competición directa entre los mecanismos de nucleación y crecimiento cristalino, los cuales vienen a su vez gobernados por la evolución espacio-temporal de la sobresaturación ( $\beta$ ) durante la precipitación.<sup>(11)</sup> Así pues, para obtener materiales particulados con tamaños de partícula pequeños y distribuciones estrechas de tamaño de partícula, por esta vía de preparación, es necesario alcanzar elevados valores de  $\beta$  en espacios de tiempo muy cortos, que favorezcan la nucleación frente al crecimiento cristalino, y además que la evolución de  $\beta$  en toda la disolución sea lo más homogénea posible. En los métodos tradicionales de precipitación desde disolventes

líquidos, la variación de  $\beta$  se induce mediante la modificación de la capacidad solvatante del disolvente a través de variaciones de la temperatura o composición del sistema, por ejemplo mediante la adición de antisolventes, de sales, o por evaporación.



**Figura 5.1.** Evolución de la sobresaturación ( $\beta$ ) durante una precipitación, inducida por un enfriamiento externo, en función del tiempo: En un reactor de tamaño pequeño (A) la velocidad de transmisión de calor es rápida, y se alcanzan valores de  $\beta$  de manera homogénea en toda la disolución. En cambio, en un reactor de tamaño mayor (B) dicha transmisión es más lenta, y por tanto los valores de  $\beta$  son menos homogéneos en toda la disolución.

El control del tamaño de partícula en procesos de precipitación convencionales es muy difícil (ver Capítulo 2), ya que en el estado líquido la transmisión de las variaciones de temperatura y composición es lenta. En estos procesos es difícil alcanzar elevados valores de sobresaturación y son necesarios sistemas de agitación o mezclado muy eficientes, los cuales son muy difíciles de escalar, para asegurar una elevada homogeneidad de la sobresaturación en todos los puntos de la disolución. Asimismo, cuanto mayor sea el volumen del reactor en el que se da una precipitación o mayores sean los volúmenes a mezclar en la precipitación más difícil será conseguir variaciones de sobresaturación homogéneas en todos los puntos de la disolución (ver Figura 5.1). Así pues, este tipo de metodologías ascendentes basadas en precipitaciones desde disolventes líquidos, producen sólidos particulados con distribuciones anchas de tamaño de partícula, la cuales han de someterse a procesos posteriores de trituración, micronización y homogeneización para alcanzar el tamaño micro- o nanoscópico deseado.<sup>(12)</sup>

Desde hace varios años, una de las estrategias que está despertando más interés son los procesos de precipitación en entornos confinados (vesículas, micelas, microemulsiones, etc.).<sup>(13)</sup> La utilización de microemulsiones es de gran interés para realizar precipitaciones en entornos confinados, ya que es mucho más fácil realizar con ellas cambios de la composición de manera controlada, dado el pequeño tamaño de la fase dispersa. Además, comparando con los métodos directos de precipitación, los

procesos de precipitación utilizando microemulsiones ofrecen ventajas adicionales en la preparación de materiales con tamaños de partícula pequeños, además de un mayor control de la forma, cristalinidad, y propiedades superficiales de la partícula.<sup>(14)</sup> En estos métodos, la precipitación tiene lugar de forma confinada en los dominios dispersos de la microemulsión, los cuales actúan como pequeños reactores.<sup>(15)</sup> El principal problema que presentan las emulsiones líquido-líquido para emplearlas como reactores es la separación y eliminación de los disolventes después de la formación del material particulado. Además, la uniformidad de las características estructurales (tamaño, morfología, cristalinidad, etc.) de los materiales micro- y nanoparticulados preparados mediante microemulsiones, está estrechamente ligado al grado de homogeneidad con que puedan producirse las transiciones de fases, responsables de la precipitación, en estos sistemas.<sup>(16)</sup>

Las transiciones de fase en microemulsiones líquidas pueden inducirse por variaciones de temperatura, o por cambios de composición del sistema como la adición de tensoactivos, sales inorgánicas o hidrocarburos.<sup>(17)</sup> Ahora bien, la inducción de transiciones de fase por cambios de temperatura y/o composición, es difícil de realizar a escala industrial debido a la baja eficiencia en la transmisión de la variación de estas variables en los medios líquidos.<sup>(18)</sup> Por otra parte, la adición de tensoactivos o sales, puede conllevar costes económicos y ambientales adicionales, e inducir la contaminación o modificación indeseada de los productos finales. Así pues, en que la utilización de microemulsiones para la preparación de materiales nanoparticulados pueda darse a escala industrial, actualmente existe un gran interés en encontrar sistemas con los que se puedan formar y destruir microemulsiones de manera controlada, reversible, reproducible, fácil de escalar, económica y respetuosa con el medio ambiente.

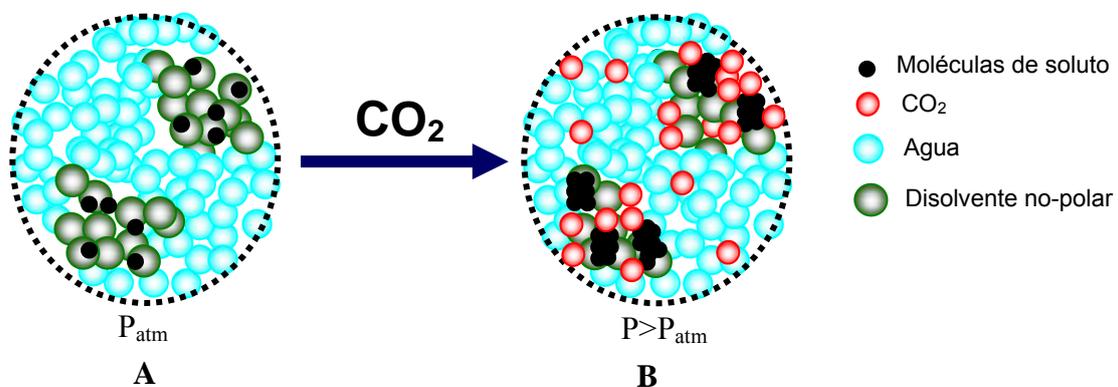
Como ya se ha descrito anteriormente, los fluidos comprimidos permiten en bastantes casos sustituir los disolventes orgánicos en el procesado de materiales.<sup>(19)</sup> Esto es debido a que el poder disolvente de los FCs, en estado líquido ó supercrítico, puede ser modificado mediante cambios de presión, que se transmiten mucho más rápido y de forma más homogénea que los cambios de temperatura y composición. Además, los FCs son fáciles de eliminar, y muchas veces presentan en su seno velocidades de difusión muy superiores a las de los disolventes líquidos tradicionales.<sup>(20)</sup> Así pues, el desarrollo de nuevos métodos de obtención de partículas que combinen la flexibilidad de la ingeniería de partículas que proporcionan las microemulsiones con la eficiencia a

gran escala que presentan los FCs podría ser muy ventajoso.<sup>(21)</sup> Las microemulsiones basadas en FCs presentan además otras ventajas como son que su formación, manipulación, y destrucción es totalmente reversible, pudiendo ser gobernada mediante cambios de presión.<sup>(22)</sup> Otras de las ventajas de utilizar microemulsiones con FCs para la preparación de materiales micro- y nanoparticulados, es la rápida y fácil eliminación del disolvente del producto final mediante la despresurización del sistema.<sup>(18),(23)</sup> Así pues, actualmente ya existen varios métodos basados en la utilización de microemulsiones con CO<sub>2</sub> comprimido para preparar micro- y nanopartículas.

### 5.1.1 Preparación de sólidos micro- y nanoparticulados mediante microemulsiones con CO<sub>2</sub>

Actualmente se distinguen básicamente tres tipos de metodologías para la preparación de partículas basadas en el empleo de microemulsiones y CO<sub>2</sub>, las cuales difieren en varios aspectos.

En la primera metodología, la síntesis de las partículas se lleva a cabo por un efecto antisolvente del CO<sub>2</sub> (“gas antisolvent”, GAS) sobre una microemulsión o/w del soluto a precipitar.

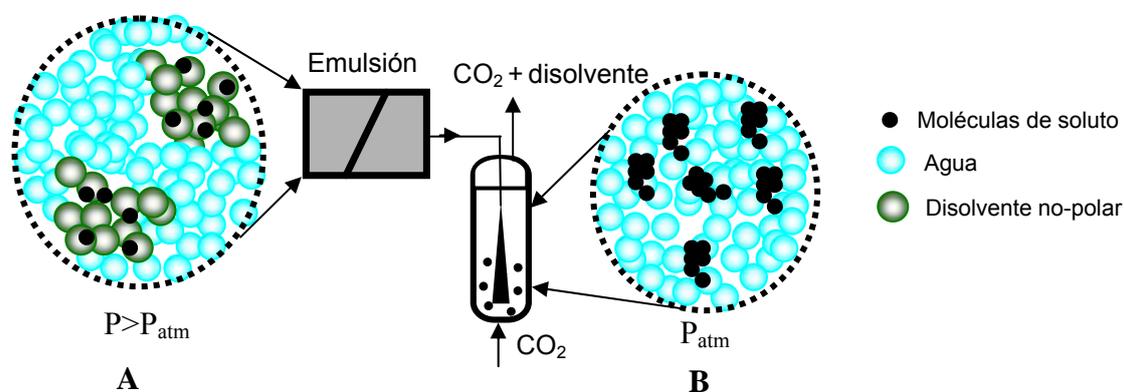


**Figura 5.2.** Esquema del proceso de precipitación confinada basado en el efecto antisolvente del CO<sub>2</sub> sobre microemulsiones o/w. (A) Soluto no-polar disuelto en nanodominios formados por un disolvente no-polar, libres de moléculas de agua. (B) Precipitación del soluto inducida por el efecto antisolvente del CO<sub>2</sub>.

Esta metodología fue desarrollada por Zhang et al. y comprende dos etapas.<sup>(24)</sup> En la primera etapa, se prepara una microemulsión o/w, con la ayuda de tensoactivos, empleando agua y un disolvente no-polar, normalmente iso-octano, que contiene el soluto a precipitar. La segunda etapa consiste en la precipitación confinada del sólido disuelto en los dominios nanoscópicos de fase discontinua, mediante la adición de CO<sub>2</sub>

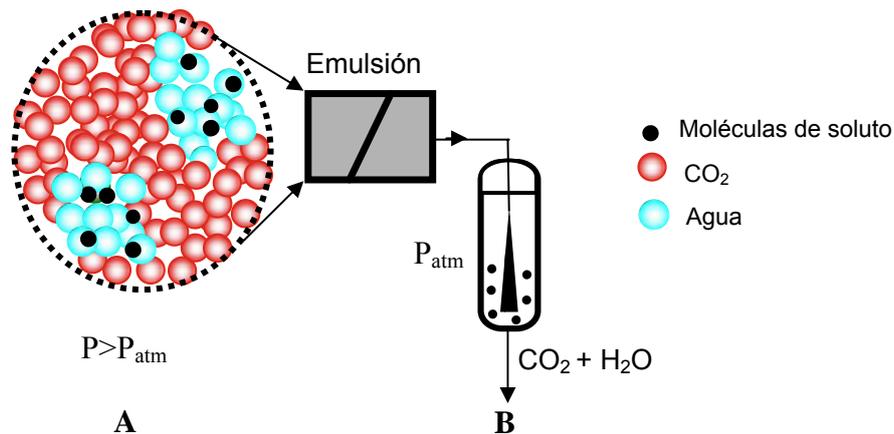
líquido a alta presión a la microemulsión (ver Figura 5.2). Con esta tecnología, se han conseguido precipitar micro- y nanopartículas de plata, de proteínas y sulfuro de zinc, entre otros solutos.<sup>(24)</sup>

La segunda metodología, denominada “supercritical fluid extraction emulsion” (SFEE), se basa en la precipitación de micro- y nanopartículas a partir de la extracción del disolvente no-polar de una microemulsión o/w utilizando CO<sub>2</sub>. Esta metodología fue desarrollada por la empresa “Ferro Corporation” y consta de dos etapas.<sup>(25)</sup> En la primera etapa, denominada de preparación de la microemulsión, el soluto a precipitar se disuelve en un disolvente no-polar saturado con agua, y en la fase acuosa se disuelve el tensoactivo a la vez que se satura con el mismo disolvente no-polar. Ambas disoluciones se mezclan para formar una emulsión. La emulsión resultante se homogeneiza en un homogenizador convencional, obteniéndose una microemulsión. En la segunda etapa, la microemulsión obtenida se pulveriza a través de una boquilla en una columna de extracción por donde circula a contracorriente un flujo de CO<sub>2</sub> líquido. Las gotitas de la emulsión entran en contacto con el CO<sub>2</sub> y éste extrae el disolvente no-polar de las mismas, precipitando el producto en forma de finas partículas suspendidas en la fase acuosa (ver Figura 5.3). Por tanto, mediante esta tecnología la precipitación de las partículas tiene lugar por el efecto extractor del disolvente no-polar que realiza el CO<sub>2</sub> líquido, lo que provoca la precipitación del soluto. Mediante esta tecnología se han conseguido precipitar partículas de acetato de colesterol, griseofulvina, acetato de megestrol,<sup>(26)</sup> indometacina, ketofreno,<sup>(27)</sup> ácido poli(láctico/glicólico),<sup>(28)</sup> además de metacrilato de metilo (eudragit RS) y sílica, entre otros compuestos.<sup>(29)</sup>



**Figura 5.3.** Esquema del proceso de precipitación de partículas basado en la extracción del disolvente orgánico por el CO<sub>2</sub>. (A) Solutos no-polar disueltos en nanodominios formados por un disolvente no-polar, libres de moléculas de agua. (B) Precipitación del soluto inducida por la extracción del disolvente orgánico por el CO<sub>2</sub>.

La tercera metodología de precipitación de partículas se basa en la utilización de emulsiones w/CO<sub>2</sub> formadas por agua como medio discontinuo y CO<sub>2</sub> como medio continuo. En este método no se utilizan disolventes orgánicos, por lo que su ámbito de aplicación es algo más limitado respecto a los dos métodos anteriores. Dentro de esta metodología podemos distinguir dos tipos de precipitaciones distintas. En primer lugar está la desarrollada por la empresa “Ferro Corporation”,<sup>(30)</sup> que se basa en la pulverización de una microemulsión formada por agua y CO<sub>2</sub> dentro de un reactor, y una posterior eliminación de los disolventes para obtener finalmente las partículas. La síntesis comprende tres etapas. En una primera, se prepara una emulsión a una cierta presión de trabajo,  $P_w$ , cuya fase continua esta formada por un fluido comprimido o supercrítico, como el CO<sub>2</sub>, y la fase discontinua por una disolución, preferiblemente acuosa, del soluto a precipitar. En una segunda etapa, la microemulsión se pulveriza a través de una boquilla, con lo que el CO<sub>2</sub> de las pequeñas gotitas que se forman, se evapora, arrastrando el agua e induciendo la precipitación de las partículas (ver Figura 5.4).<sup>(30)</sup>



**Figura 5.4.** Esquema del proceso de precipitación de partículas basado en emulsiones “water-in-CO<sub>2</sub>”. (A) Soluto disuelto en nanodominios formados por agua, libres de moléculas de CO<sub>2</sub>. (B) Precipitación del soluto inducida por la eliminación del CO<sub>2</sub> y el agua.

El otro método de precipitación, que emplea emulsiones w/CO<sub>2</sub> formadas por agua como medio discontinuo y CO<sub>2</sub> como medio continuo, se basa en la precipitación de partículas a partir de la mezcla de dos emulsiones w/CO<sub>2</sub>. En este método la síntesis de las partículas comprende dos etapas. En una primera etapa se prepararan dos emulsiones diferentes cuyas fases continuas están formadas por un fluido comprimido o supercrítico (CO<sub>2</sub>) y las fases discontinuas por una disolución, preferiblemente acuosa, de los reactivos. En una segunda etapa, las dos microemulsiones se mezclan, y debido al

carácter dinámico de estos sistemas, en los cuales se producen intercambios continuos de materiales entre los diferentes dominios, se produce la reacción entre los reactivos confinados obteniéndose el producto final en forma de micro- y nanopartículas. Este proceso ha sido empleado por Wai et al. para la preparación de nanopartículas de plata.<sup>(18), (31)</sup>

En base a estos antecedentes, y para extender el campo de aplicación de las microemulsiones con FCs, en la presente Tesis Doctoral se pensó en utilizar las microemulsiones o/w con disolventes expandidos con CO<sub>2</sub>, descritas en el capítulo anterior, como reactores a escala nanoscópica para la realización de precipitaciones confinadas. Así, en la siguiente sección, se describirá el estudio de la viabilidad de utilizar microemulsiones con acetona expandida con CO<sub>2</sub> como fase discontinua, para la obtención de materiales micro- y nanoparticulados mediante precipitaciones confinadas.

## **5.2 Precipitación confinada en microemulsiones o/w con acetona expandida con CO<sub>2</sub>**

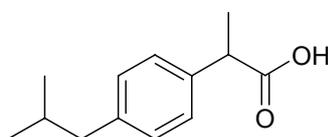
En el Capítulo 4 (Apartado 4.2.4), se describió como la adición de CO<sub>2</sub> sobre una mezcla “acetona/agua” conduce, bajo ciertas condiciones de presión, temperatura y composición, a la formación de microemulsiones o/w del tipo  $\mu(L_2@L_1)$ , en las que la fase discontinua, L<sub>2</sub>, está constituida por acetona expandida con CO<sub>2</sub> y la fase continua, L<sub>1</sub>, es de naturaleza acuosa. Además, estas microemulsiones son estables con el tiempo y pueden formarse y destruirse reversiblemente mediante simples cambios de presión.

Debido a esta última característica, se pensó en estudiar la posibilidad de emplear dichas microemulsiones  $\mu(L_2@L_1)$  para la realización de precipitaciones confinadas de solutos disueltos en los dominios de dimensiones nanoscópicas de naturaleza L<sub>2</sub>. El soluto que se eligió como modelo para realizar dicho estudio debía cumplir los siguientes requisitos:

1. Ser insoluble o ligeramente soluble en agua.

2. Ser soluble en mezclas “acetona/CO<sub>2</sub>” a unas condiciones de presión, temperatura y composición ( $X_{CO_2}$ )<sup>t</sup> en las que los sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” pudieran encontrarse formando microemulsiones o/w del tipo  $\mu(L_2@L_1)$ .

De acuerdo con estos criterios, se seleccionó como soluto modelo el ácido (R,S)-2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoico, más conocido como ibuprofeno. El ibuprofeno es un fármaco de naturaleza no esteroide, ampliamente usado como anti-inflamatorio y analgésico en el tratamiento de dolores y fiebre de baja intensidad.<sup>(33)</sup> Este compuesto es prácticamente insoluble en agua y es soluble en disolventes orgánicos como la acetona.

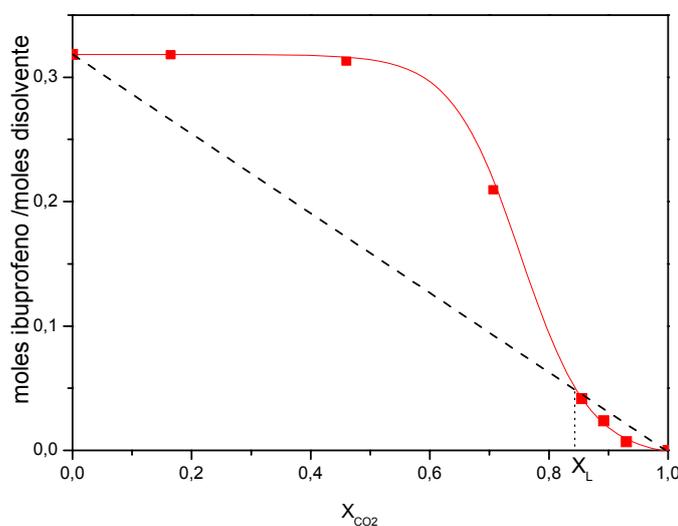


**Figura 5.5.** Estructura molecular del (R,S)-ibuprofeno.

Debido a su elevada insolubilidad en agua, dicho fármaco presenta bajas velocidades de absorción en la mucosa intestinal, lo que limita considerablemente su absorción por ingesta oral.<sup>(34)</sup> Se ha constatado que su suministro como sólido micro- y submicroparticulado o como suspensión mejora de manera significativa su velocidad de absorción.<sup>(35)</sup> Las metodologías convencionales de preparación de ibuprofeno en forma de nanopartículas,<sup>(36)</sup> nanosuspensiones,<sup>(37)</sup> dispersiones sólidas,<sup>(38)</sup> complejos de inclusión,<sup>(39)</sup> microcapsulas,<sup>(40)</sup> etc. son muy costosas y complejas, presentando numerosas dificultades en su escalado y producción. Además, la realización de este tipo de procesos comporta problemas de agregación y coagulación entre las partículas durante su procesamiento, con importantes implicaciones en el almacenamiento y la administración del producto.<sup>(41)</sup> Una consecuencia directa de la agregación es una disminución de la velocidad de disolución del fármaco, debido a una disminución de su área superficial efectiva.<sup>(42)</sup> Por lo tanto, actualmente la preparación de partículas de ibuprofeno de dimensiones submicroscópicas, que no presenten problemas de agregación, sigue siendo un reto de gran interés industrial.

<sup>t</sup> $X_{CO_2}$ =moles CO<sub>2</sub>/ (moles CO<sub>2</sub> + moles disolvente).

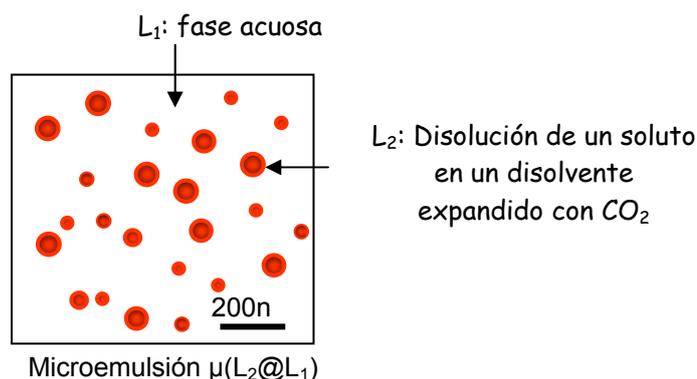
Por otra parte, el ibuprofeno es un compuesto relativamente barato, de fácil manejo, y de baja toxicidad si su manipulación es adecuada. Además, existen precedentes en la utilización del ibuprofeno como compuesto modelo en el desarrollo de otras metodologías, que proporciona ventajas adicionales en su utilización como compuesto modelo para el estudio de viabilidad de una nueva metodología de precipitación.<sup>(41),(42),(47)</sup> Además, en el grupo de investigación en el que se ha realizado la presente Tesis Doctoral, se había observado recientemente que este fármaco poseía una solubilidad muy elevada en mezclas “acetona/CO<sub>2</sub>”.<sup>(44),(45)</sup> En la Figura 5.6 se muestra la variación de solubilidad del ibuprofeno con el contenido en CO<sub>2</sub>, en una mezcla binaria “acetona/CO<sub>2</sub>” a P<sub>w</sub>=10MPa y T<sub>w</sub>=308. En dicho diagrama, se observa que el CO<sub>2</sub> actúa como cosolvente hasta valores de X<sub>CO<sub>2</sub></sub> elevados.<sup>(44)</sup> Efectivamente, la concentración de CO<sub>2</sub> límite, X<sub>L</sub>, a partir de la cual el CO<sub>2</sub> tiene un efecto antisolvente en el sistema “ibuprofeno/acetona/CO<sub>2</sub>” es de 0,82, y corresponde al punto de intersección entre la curva de solubilidad del ibuprofeno y la variación lineal ideal de la solubilidad con la fracción molar de CO<sub>2</sub>.



**Figura 5.6.** Valores de solubilidad del ibuprofeno en mezclas “acetona/CO<sub>2</sub>” a P<sub>w</sub>=10 MPa y T<sub>w</sub>=308 K medidos en un analizador de fases a alta presión mediante el método del punto evanescente (■); Ajuste realizado para visualizar la evolución de la solubilidad con el contenido en CO<sub>2</sub> en la mezcla disolvente(□□). Variación de la solubilidad según un proceso de dilución ideal (---).<sup>(45)</sup>

Tal y como se describe en el Apartado 4.2.4 del Capítulo 4, la formación de microemulsiones del tipo μ(L<sub>2</sub>@L<sub>1</sub>) en sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” a P ≤ 14MPa y

$T=308\text{K}$ , puede darse a fracciones molares de  $\text{CO}_2$  por debajo de  $X_{\text{CO}_2} < 0,3$ ,<sup>2</sup> para sistemas con proporciones agua/acetona de  $R=70/30$  y  $50/50$  (ver Tabla 4.5). Por otra parte, tal y como se observa en la Figura 5.6, a estas condiciones de presión, temperatura y composición, la mezcla “acetona/ $\text{CO}_2$ ” es un buen disolvente del ibuprofeno. Así pues, el sistema “ibuprofeno/acetona/agua/ $\text{CO}_2$ ” a  $P_w=10\text{MPa}$  y  $T_w=308\text{K}$  reunía todas las características necesarias para evaluar la capacidad de emplear microemulsiones con disolventes expandidos con  $\text{CO}_2$  en la realización de precipitaciones confinadas.



**Figura 5.7.** Esquema de una microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$  donde nanodominios de una disolución expandida con  $\text{CO}_2$ ,  $L_2$ , se encuentran dispersos en un medio acuoso,  $L_1$ .

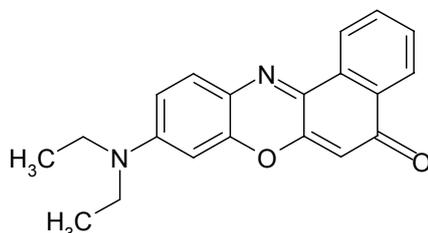
### 5.2.1 Formación de microemulsiones o/w en el sistema “ibuprofeno/acetona/agua/ $\text{CO}_2$ ”

En el presente apartado, se describe el estudio realizado para determinar si el sistema “ibuprofeno/acetona/agua/ $\text{CO}_2$ ” puede formar, bajo ciertas condiciones de presión, temperatura y composición, microemulsiones o/w, tal y como ya se había observado para el sistema “acetona/agua/ $\text{CO}_2$ ”, libre de ibuprofeno (ver Apartado 4.2.4, Capítulo 4). Este estudio se realizó, utilizando el analizador de fases y el protocolo de operaciones descritos con detalle en el Capítulo 4 y en la Parte Experimental. Ahora bien, en este caso, en lugar de disolvente puro, acetona, se adicionaron a la celda de

<sup>2</sup>  $X_{\text{CO}_2} = \text{moles } \text{CO}_2 / (\text{moles } \text{CO}_2 + \text{moles disolvente})$ .

volumen variable disoluciones de ibuprofeno en acetona con una sobresaturación conocida,  $\beta$ ,<sup>3</sup> para formar el sistema “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” deseado.

Todos los sistemas que se estudiaron se analizaron a 308 K, de la misma manera que se había hecho con los sistemas “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” en ausencia de ibuprofeno. Mediante una inspección visual, a través de la mirilla de la celda de volumen variable (Figura 5.10), y mediante medidas de densidad óptica (Figuras 5.9 y 5.11) se caracterizó la evolución de la composición de fases del sistema “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” y de su estructura al variar su contenido en CO<sub>2</sub> y la presión. Para poder facilitar el análisis del sistema por inspección visual, se empleó el colorante rojo Nilo, representado en la Figura 5.8, que es soluble en acetona e insoluble en agua y CO<sub>2</sub> líquido, y por lo tanto, permite detectar la naturaleza de las distintas fases líquidas presentes en el sistema. En todos los experimentos que se realizaron se introdujeron en la celda de volumen variable 0,5mg de ese colorante mediante su disolución en acetona. Las variaciones de densidad óptica ( $OD_\lambda$ ) del sistema se realizaron mediante la medida de la absorción de la mezcla a una  $\lambda=500$  nm; longitud de onda en la cual ninguno de los componentes presentaba absorción alguna.



**Figura 5.8.** Representación de la estructura química del Rojo Nilo.

Los resultados obtenidos, que se reúnen en la Tabla 5.1 muestran que el sistema “ibuprofeno/acetona/agua” con  $R= 70/30$  y  $\beta=0,63$  (Punto 1 – Tabla 5.1) está formado por una fase sólida (S), compuesta por ibuprofeno, y una fase líquida L de color rosa debido a la presencia del colorante rojo Nilo. Dicho color indica que la fase líquida está constituida por una mezcla de acetona y agua. El valor de la densidad óptica observada de 2,86 de este sistema, es consecuencia de la luz dispersada por las partículas de ibuprofeno suspendidas en el medio (Punto 1 - Tabla 5.1 y Figuras 5.9 y 5.10). Al adicionar progresivamente CO<sub>2</sub> se observa una desaparición paulatina de la fase sólida

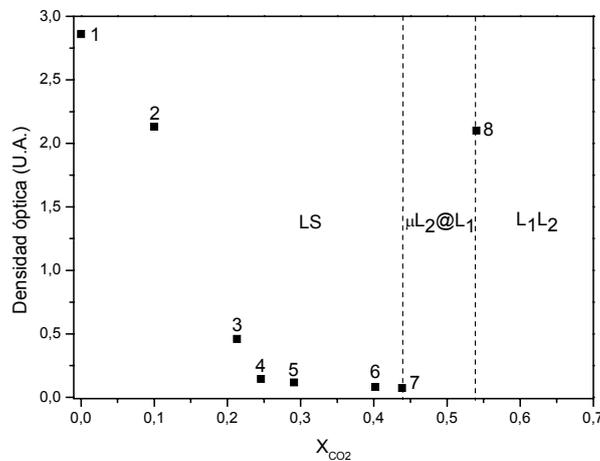
<sup>3</sup>  $\beta = C/C_s$ ; C: moles IBU/mL acetona;  $C_s$ : moles saturación IBU/mL acetona.

disminuyendo la turbidez del sistema y el valor de la densidad óptica, hasta que el sistema se transforma a una  $X_{CO_2}=0,44$  en una sola fase transparente de color rosado. Sin embargo a éstas condiciones, el valor de la  $OD_\lambda$  es aún superior a 0 (Punto 7 – Tabla 5.1 y Figura 5.9), lo que indica que el sistema posee una cierta estructuración y se encuentra formando una microemulsión de tipo  $\mu(L_2@L_1)$ . Es interesante destacar que entre  $X_{CO_2}=0,44$  y por debajo de  $X_{CO_2}=0,54$  (entre los puntos 7 y 8 – Tabla 5.1), el sistema se mantiene como una microemulsión estable termodinámicamente en la que el ibuprofeno se encuentra totalmente disuelto.

**Tabla 5.1.** Análisis de las fases del sistema “ibuprofeno/acetona/agua/ $CO_2$ ” a  $T=308K$ ,  $P=10MPa$ ,  $R=70/30$ ,  $\beta=0,63$  y diferentes contenidos de  $CO_2$ .

| Punto | $X_{CO_2}^a$ | Inspección visual | Color             | O.D. <sup>b</sup> | Fases <sup>c</sup> |
|-------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| 1     | 0            | Turbio            | Rosado            | 2,86              | LS                 |
| 2     | 0,10         | Turbio            | Rosado            | 2,13              | LS                 |
| 3     | 0,21         | Turbio            | Rosado            | 0,46              | LS                 |
| 4     | 0,25         | Turbio            | Rosado            | 0,14              | LS                 |
| 5     | 0,29         | Turbio            | Rosado            | 0,12              | LS                 |
| 6     | 0,40         | Turbio            | Rosado            | 0,09              | LS                 |
| 7     | 0,44         | Transparente      | Rosado            | 0,08              | $\mu(L_2@L_1)$     |
| 8     | 0,54         | Separación        | Rosado + Incoloro | 2,10              | $L_1L_2$           |

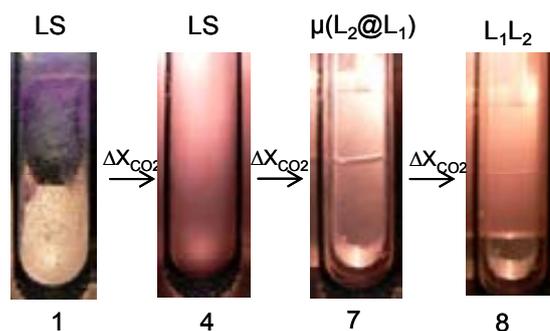
[a]  $X_{CO_2}$ =moles  $CO_2$ /(moles  $CO_2$ +moles acetona). [b] Densidad óptica. [c] Fases observadas en el sistema: L, una sola fase líquida rica en acetona y agua; S: sólido;  $L_1$ : fase acuosa;  $L_2$ : fase orgánica;  $\mu L_2@L_1$ , microemulsión;  $L_1L_2$ , dos fases líquidas separadas.



**Figura 5.9.** Estudio de la evolución de la densidad óptica ( $OD_{\lambda=500nm}$ ) del sistema “ibuprofeno/acetona/agua/ $CO_2$ ” a  $R=70/30$  y  $\beta=0,63$ , a la temperatura de  $308K$  y la presión de  $10MPa$ , en función la fracción molar de  $X_{CO_2}$ .

Si sobre el sistema anterior se sigue adicionando más  $CO_2$ , se observa de nuevo un aumento de la turbidez y del valor de la  $OD_\lambda$ , hasta que a  $X_{CO_2}=0,54$  el sistema se escinde o se rompe en dos fases líquidas transparentes inmiscibles,  $L_1L_2$ , separadas por una sola interfase (Punto 8- Tabla 5.1 y Figura 5.10). La fase más densa,  $L_1$ , que se observa en la parte inferior de la celda es rica en agua, tal y como se deduce de la

ausencia de una coloración, debido a que el colorante rojo Nilo es insoluble en dicha fase acuosa. En cambio, la fase menos densa de la parte superior de la celda,  $L_2$ , tiene una coloración rosada debido a la presencia del colorante, lo que indica que es una fase líquida rica en acetona y  $\text{CO}_2$ . Esta observación confirma que la adición de  $\text{CO}_2$  sobre una mezcla “ibuprofeno/acetona/agua” constituida por una fase líquida y una fase sólida, conduce bajo ciertas condiciones de presión, temperatura y composición, a la formación de microemulsiones de tipo  $\mu(L_2@L_1)$  en las que existen dominios de acetona expandida con  $\text{CO}_2$ , en los que se encuentra disuelto el ibuprofeno, que se hayan dispersos en un medio rico en agua. Así pues, mientras que a  $P \leq 14\text{MPa}$  el sistema “acetona/agua/ $\text{CO}_2$ ” con  $R=70/30$  no puede formar microemulsiones estables, a valores de  $X_{\text{CO}_2}$  superiores a 0,30, se observa que el sistema “ibuprofeno/acetona/agua/ $\text{CO}_2$ ” con  $R=70/30$  y  $\beta=0,63$  puede encontrarse en forma de una microemulsión hasta valores de  $X_{\text{CO}_2}=0,54$  a la presión de 10MPa y a la temperatura de 308K.



**Figura 5.10.** Imágenes de la evolución del sistema “ibuprofeno/acetona/agua/ $\text{CO}_2$ ” con  $R=70/30$ ,  $\beta=0,63$ ,  $P=10\text{MPa}$  y  $T=308\text{K}$ , al variar el contenido en  $\text{CO}_2$ . La transición entre los puntos  $1 \rightarrow 4 \rightarrow 7 \rightarrow 8$  es debida a incrementos progresivos en la  $X_{\text{CO}_2}$  (ver Tabla 5.1).

### 5.2.2 Efecto de la variación de la presión sobre microemulsiones o/w formadas por “ibuprofeno/acetona/agua/ $\text{CO}_2$ ”

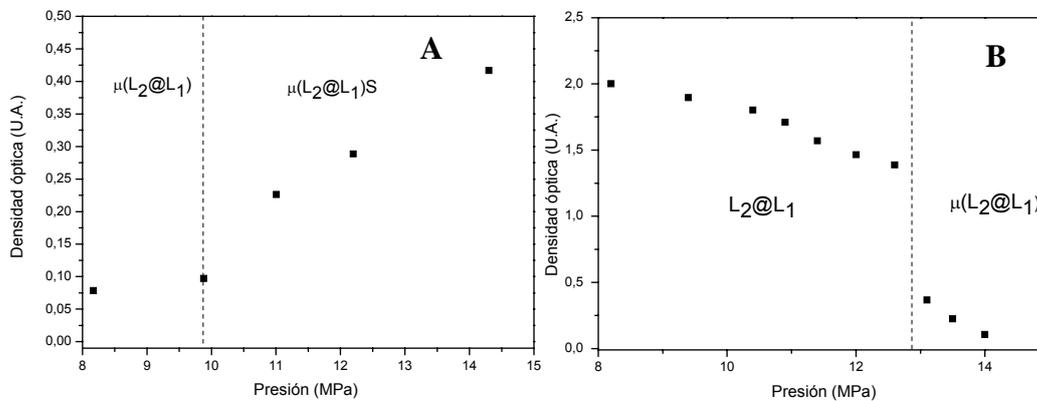
En este punto se creyó interesante estudiar el efecto de la variación de la presión sobre las microemulsiones de tipo  $\mu(L_2@L_1)$  de “ibuprofeno/acetona/agua/ $\text{CO}_2$ ”, descritas en el apartado anterior. Así, al variar la presión sobre una microemulsión con  $X_{\text{CO}_2}=0,44$  (Punto 1 – Tabla 5.2) se observa que en todo el rango de presiones que va desde 8MPa (Punto 1 – Tabla 5.2) hasta 10MPa (Punto 2 – Tabla 5.2) el valor de la densidad óptica ( $\text{OD}_\lambda$ ) se mantiene por encima de 0, y se observa además visualmente

una fase transparente, lo que indica que en este rango de presiones el sistema sigue formado por una microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$  estructurada a nivel nanoscópico (ver Figura 5.11). Al seguir aumentando la presión, se observa que el valor de la densidad óptica sufre un aumento brusco (Figura 5.11), desde un valor de 0,08 a 10MPa (Punto 2 – Tabla 5.2) a un valor de 0,27 a 12,2 MPa (Punto 3. – Tabla 5.2), coincidiendo con un cambio del aspecto visual del sistema de transparente a turbio (Figura 5.12). En la grafica de la Figura 5.11 se observa que el aumento progresivo de la presión desde 12,2MPa conlleva también un aumento de la  $OD_{\lambda}$  hasta alcanzar un valor de 0,41 a la presión de 14,3 MPa (Punto 5 – Tabla 5.2)

**Tabla 5.2.** Análisis de fases del sistema “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” a T=308K, X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=0,44, R=70/30,  $\beta=0,63$ , al someterlo a cambios de presión.

| Punto | P(MPa) <sup>a</sup> | Inspección visual | Color  | O.D. <sup>b</sup> | Fases <sup>c</sup> |
|-------|---------------------|-------------------|--------|-------------------|--------------------|
| 1     | 8                   | Transparente      | Rosado | 0,07              | $\mu(L_2@L_1)$     |
| 2     | 10                  | Transparente      | Rosado | 0,08              | $\mu(L_2@L_1)$     |
| 3     | 12,2                | Turbio            | Rosado | 0,27              | $\mu(L_2@L_1)S$    |
| 4     | 13,5                | Turbio            | Rosado | 0,27              | $\mu(L_2@L_1)S$    |
| 5     | 14,3                | Turbio            | Rosado | 0,41              | $\mu(L_2@L_1)S$    |

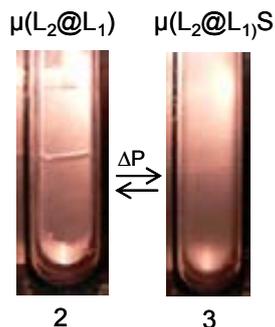
[a] Presión del sistema. [b] X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=moles CO<sub>2</sub>/(moles CO<sub>2</sub> + moles acetona). [c] Densidad óptica. [d] Fases observadas en el sistema: S: sólido; L<sub>1</sub>: fase acuosa; L<sub>2</sub>: fase orgánica;  $\mu(L_2@L_1)$ , microemulsión.



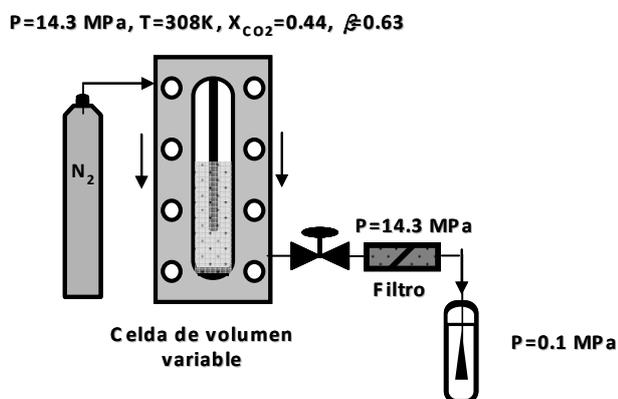
**Figura 5.11.** Estudio de la evolución de la densidad óptica ( $OD_{\lambda=500nm}$ ) de los sistemas: (A) “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” con R=70/30,  $\beta=0,63$ , X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=0,44 y T=308K y (B) “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” con R=70/30, X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=0,26 y T=308K, en función de la presión del sistema.

El aumento de la densidad óptica y la turbidez observados al aumentar la presión sobre la microemulsión indica la aparición de una nueva fase en el sistema y un aumento progresivo de las dimensiones de ésta. Para identificar la naturaleza de esa nueva fase, se filtró el contenido del analizador de fases a la presión de 14,3MPa,

mediante la colocación de un filtro en serie, previamente presurizado, a la salida de la celda de volumen variable (ver Figura 5.13), recogándose en él un sólido blanco.

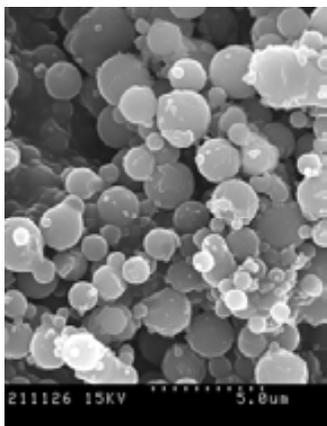


**Figura 5.12.** Imágenes de la evolución del sistema “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” con  $R=70/30$ ,  $\beta=0,63$ ,  $X_{CO_2}=0,44$  y  $T=308$ , al variar la presión. La transición entre los puntos 2→3 es debida a un incremento en la presión (ver Tabla 5.2).



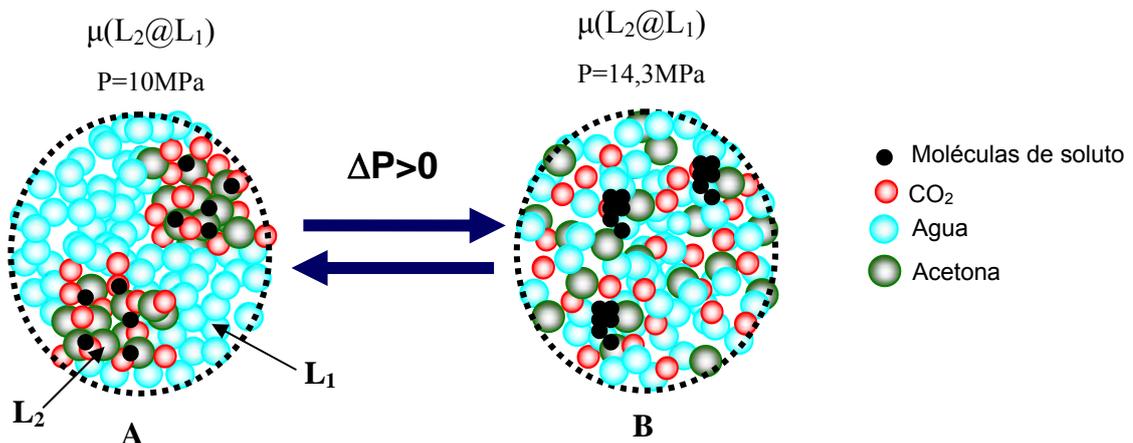
**Figura 5.13.** Diagrama de flujo de la celda de volumen variable con el filtro colocado en serie empleado en el experimento.

Tal y como muestran las imágenes de SEM de la Figura 5.14, en dicho filtro se recogió un sólido con un tamaño medio de partícula submicrónico, el cual se identificó por espectroscopia de infrarrojo como ibuprofeno puro.



**Figura 5.14.** Imagen de SEM de partículas de ibuprofeno obtenidas mediante un aumento de presión sobre una microemulsión o/w de “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>”.

Como se ha explicado en el Capítulo anterior (ver Apartado 4.2.4.2) y como se representa de nuevo en la Figura 5.11, el aumento de la presión sobre una microemulsión de tipo  $\mu(L_2@L_1)$  provoca una disminución del tamaño de los dominios dispersos de  $L_2$  en  $L_1$ . En base a este comportamiento, una posible explicación de la aparición de una fase sólida de ibuprofeno al aumentar la presión sobre una microemulsión sería la que se esquematiza en la Figura 5.15. Así, el aumento de la presión provocaría en este caso una reestructuración de la microemulsión, con una disminución del tamaño de los nanodominios de  $L_2$  dispersos en el medio acuoso. Esta reestructuración, probablemente comportaría una mayor interpenetración o contacto entre las fases  $L_1$  y  $L_2$ , con lo que se manifestaría el carácter antisolvente del agua presente en  $L_1$  sobre el ibuprofeno disuelto en los nanodominios de  $L_2$ , provocando su precipitación y el aumento de la  $OD_\lambda$  del sistema.

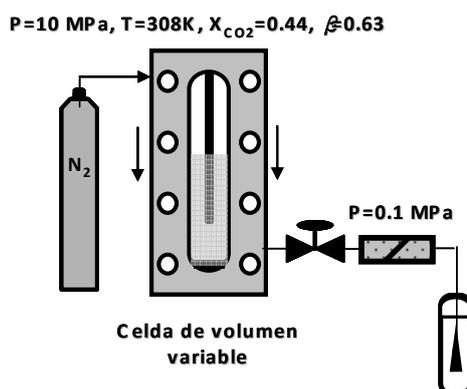


**Figura 5.15.** Esquema del proceso de precipitación confinada basado en el efecto antisolvente del agua sobre microemulsiones o/w. (A) Solute disuelto en nanodominios formados por acetona expandida con  $\text{CO}_2$ , libres de moléculas de agua. (B) Precipitación del soluto inducida por el efecto antisolvente del agua provocado por un aumento de la presión en el sistema.

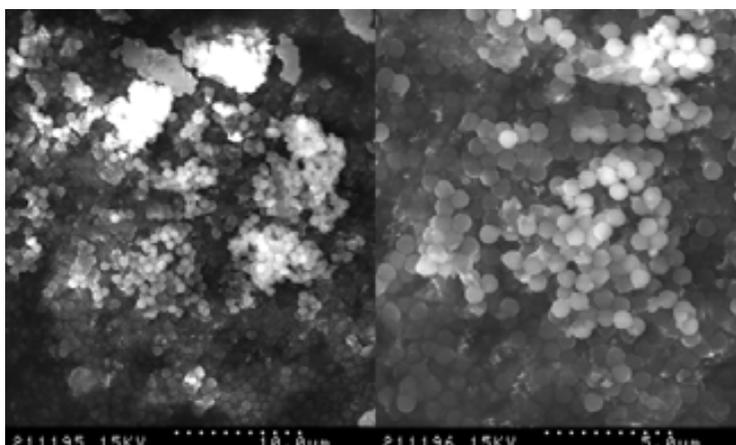
Así pues, parece muy razonable pensar que la aparición de una fase sólida de ibuprofeno en forma de partículas de dimensiones submicrónicas, al aumentar la presión sobre una microemulsión  $\mu L_2@L_1$ , sea debida a la precipitación confinada que experimenta el ibuprofeno al aumentar la presencia de agua en los nanodominios de acetona expandida con  $\text{CO}_2$ , en los que se encontraba disuelto. En esta precipitación se aprovecha el carácter dinámico de las microemulsiones  $\mu(L_2@L_1)$ , que puede ser gobernado mediante cambios de presión, lo que permite manifestar a voluntad el carácter antisolvente de la fase continua acuosa sobre un soluto disuelto en la fase dispersa orgánica  $L_2$  de la microemulsión, provocando con ello la precipitación del

soluto disuelto en ella de manera confinada (Figura 5.15). A este nuevo fenómeno de precipitación inducido por la compresión, esquematizado en la Figura 5.15, se le denominó *PIWASP por compresión*, acrónimo de *Pressure Induced Water Anti-Solvent Precipitation*.

En la presente Tesis Doctoral, también se creyó interesante estudiar el efecto de disminuir la presión sobre las microemulsiones o/w de “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>”. Para ello se despresurizó una microemulsión obtenida con  $\beta=0,63$ ,  $X_{CO_2}=0,44$ ,  $R=70/30$  y  $T=308K$  (Punto 7 – Tabla 5.1 y Figura 5.10), desde 10MPa hasta la presión atmosférica, colocando un filtro en serie a la salida de la celda de volumen variable (ver Figura 5.16). En dicho filtro se recogió un sólido blanco que fue identificado como ibuprofeno por espectroscopia de infrarrojo.



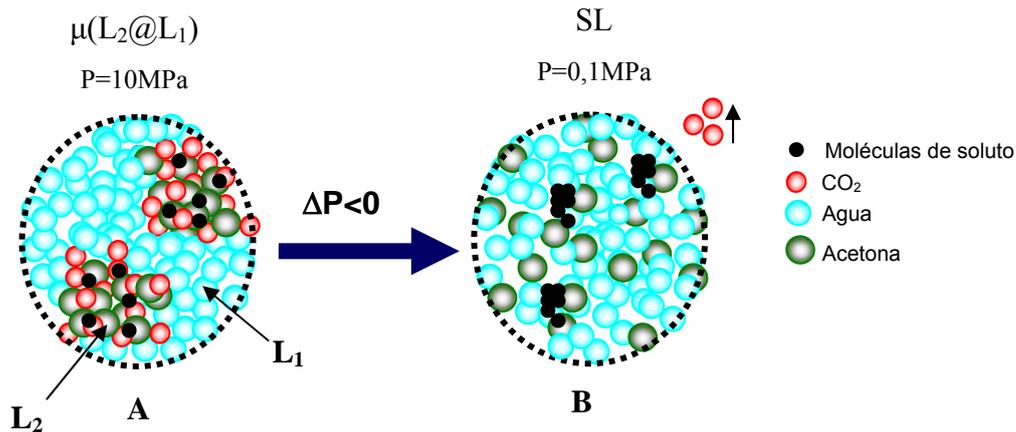
**Figura 5.16.** Diagrama de flujo de la celda de volumen variable con el filtro colocado en serie empleado en el experimento.



**Figura 5.17.** Imagen de SEM de partículas de ibuprofeno obtenidas mediante una disminución de presión sobre una microemulsión o/w de “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>”.

Las imágenes de SEM de la Figura 5.17, muestran que el sólido precipitado estaba formado por partículas de dimensiones submicrónicas con una distribución estrecha de tamaños y una morfología esferoidal muy homogénea.

En este experimento, la precipitación del ibuprofeno se podría explicar por la evaporación prácticamente total del CO<sub>2</sub> de la microemulsión al despresurizar el sistema, lo que permite que el carácter antisolvente del agua se manifieste en la mezcla resultante.



**Figura 5.18.** Esquema del proceso de precipitación confinada basado en el efecto antisolvente del agua sobre microemulsiones o/w por descompresión. (A) Solute disuelto en nanodominios formados por acetona expandida con CO<sub>2</sub>, libres de moléculas de agua. (B) Precipitación del soluto inducida por el efecto antisolvente del agua manifestado al disminuir la presión del sistema.

La extrema homogeneidad de las partículas de ibuprofeno recogidas y sus dimensiones submicrónicas, pueden explicarse por el confinamiento en el que tiene lugar la precipitación. Como está esquematizado en la Figura 5.18, la evaporación del CO<sub>2</sub> de los nanodominios L<sub>2</sub> de la microemulsión, favorece el contacto entre las moléculas de agua y acetona inicialmente separadas por el CO<sub>2</sub>, y la precipitación del ibuprofeno que se encontraba disuelto en los nanodominios L<sub>2</sub> de la microemulsión inicial. A este fenómeno de precipitación inducida por la descompresión de una microemulsión o/w se ha denominado *PIWASP por descompresión*.

La principal diferencia entre las metodologías *PIWASP por compresión* y *descompresión*, sería la fuerza promotora de la precipitación de las partículas desde la microemulsión expandida con CO<sub>2</sub>. En la metodología *PIWASP por compresión*, inicialmente se formaría una microemulsión o/w de tipo μ(L<sub>2</sub>@L<sub>1</sub>), sobre la cual un

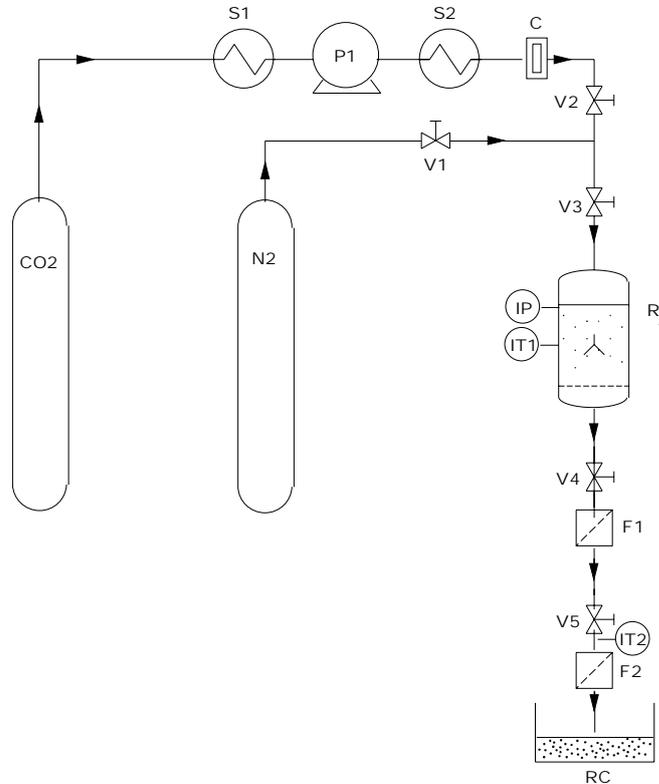
incremento de la presión provocaría un efecto antisolvente de la fase rica en agua, sobre la fase orgánica expandida  $\text{CO}_2$  en la cual se encuentra disuelto el soluto, provocando la precipitación de mismo (Figura 5.15). En cambio, la metodología *PIWASP por descompresión*, se basaría en la despresurización de una microemulsión o/w de tipo  $\mu(\text{L}_2@L_1)$ , desde la presión de trabajo hasta la presión atmosférica, lo que produciría la evaporación del  $\text{CO}_2$  que cambiaría la composición de la fase discontinua, compuesta por ibuprofeno disuelto en la acetona expandida con  $\text{CO}_2$ . Este cambio haría que la fase discontinua se enriquezca de agua con lo que el ibuprofeno disuelto precipitaría (Figura 5.18). A diferencia de lo que ocurre con el proceso *PIWASP por compresión*, este proceso es irreversible, ya que una vez despresurizado el sistema es imposible reconstituir la composición inicial de la fase discontinua.

### 5.3 Desarrollo de la metodología de precipitación basada en microemulsiones o/w generadas con $\text{CO}_2$ . El proceso PIWASP

Dada la novedad de los fenómenos de precipitación *PIWASP por compresión y por descompresión* para preparar en una sola etapa sólidos con tamaños de partícula micro- y nanoscópicos, mediante su precipitación confinada en microemulsiones o/w con disolventes expandidos con  $\text{CO}_2$ , se creyó oportuno estudiar ambos fenómenos con mayor detalle y desarrollar una metodología experimental adecuada para llevarlos a la práctica.

La configuración experimental que se diseñó para ello es la que se representa en la Figura 5.19. En esta configuración, el  $\text{CO}_2$  líquido es bombeado a través de una bomba de alta presión, *PI*, previamente enfriado por un intercambiador de calor *S1*. Antes de entrar en el reactor de alta presión *R*, el  $\text{CO}_2$  se calienta a la temperatura deseada de trabajo mediante el intercambiador de calor *S2*. El reactor autoclave *RI* posee una camisa de refrigeración conectada a un baño térmico de recirculación para regular su temperatura de trabajo. Además, *RI* está conectado a través la válvula *V4*, a un elemento filtrante, *F1*, de metal sinterizado sobre el cual hay una membrana filtrante, presurizado a la presión de del reactor,  $P_w$ . El elemento filtrante *F1*, está conectado a su vez a otro elemento filtrante *F2*, a través de la válvula de despresurización *V5*, el cual trabaja a presión atmosférica. Las aguas madres obtenidas se recogen en el colector RC. Como elementos de control, se empleó un indicador de presión en el reactor *R*, que nos

proporciona el valor de la presión de trabajo,  $P_w$  y dos indicadores de temperatura; un termopar en el interior del reactor  $R$  y otro después de la válvula de despresurización  $V5$ , que miden continuamente las temperaturas de trabajo  $T_w$  y la temperatura final de la despresurización,  $T_F$ .



**Figura 5.19.** Esquema de la configuración empleada en los experimentos PIWASP. P: bomba; C: caudalímetro másico; S: intercambiadores de calor; V: válvula; F: filtro; R1: reactor a alta presión; IT: indicador de temperatura; IP: indicador de presión; RC: colector de partículas.

Los derechos de utilización y explotación del proceso PIWASP están debidamente protegidos.<sup>(48)</sup>

### 5.3.1 Desarrollo metodológico del proceso *PIWASP por compresión*

Tal y como se esquemita en la Figura 5.20, el proceso *PIWASP por compresión* requiere en primer lugar preparar una mezcla de un disolvente orgánico, un soluto y agua, y obtener con ella una microemulsión o/w de tipo  $\mu(L_2@L_1)$  mediante la adición de CO<sub>2</sub> y el aumento de la presión del sistema hasta alcanzar una presión  $P_{1w}$ . En estas condiciones, el soluto se encuentra disuelto en los nanodominios del disolvente expandido con CO<sub>2</sub> de la microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$ , con un valor de sobresaturación menor o igual a 1. A continuación, se varía la presión del sistema desde la presión  $P_{1w}$

hasta alcanzar una presión  $P_{2w}$ , tal que  $\Delta P > 0$  ( $\Delta P = P_{2w} - P_{1w}$ ) que modifica el carácter antisolvente del medio provocando la precipitación de micro- o nanopartículas sólidas de estructura homogénea. La separación de las partículas formadas de las aguas madres debe realizarse a la presión  $P_{2w}$ , mediante un proceso de filtración a esa presión.

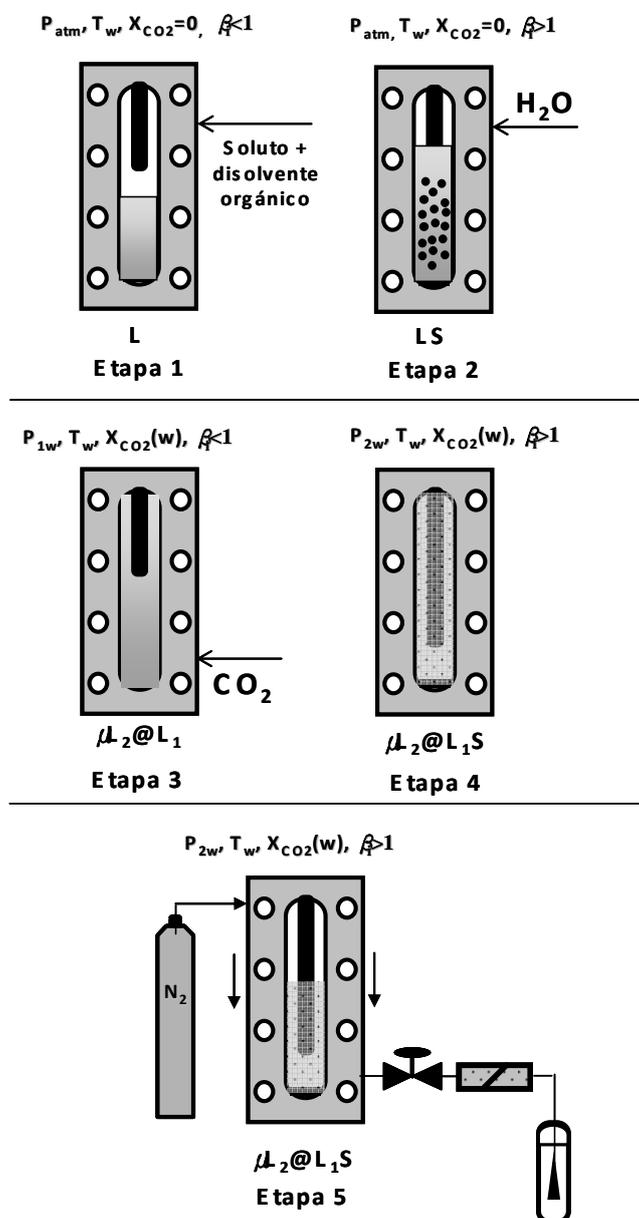


Figura 5.20. Secuencia de las etapas que requiere el método *PIWASP por compresión*

El protocolo de operaciones que se diseñó para llevar a cabo el proceso *PIWASP por compresión*, esquematizado en la Figura 5.20 empleando la configuración experimental representada en la Figura 5.19, es el que se describe a continuación:

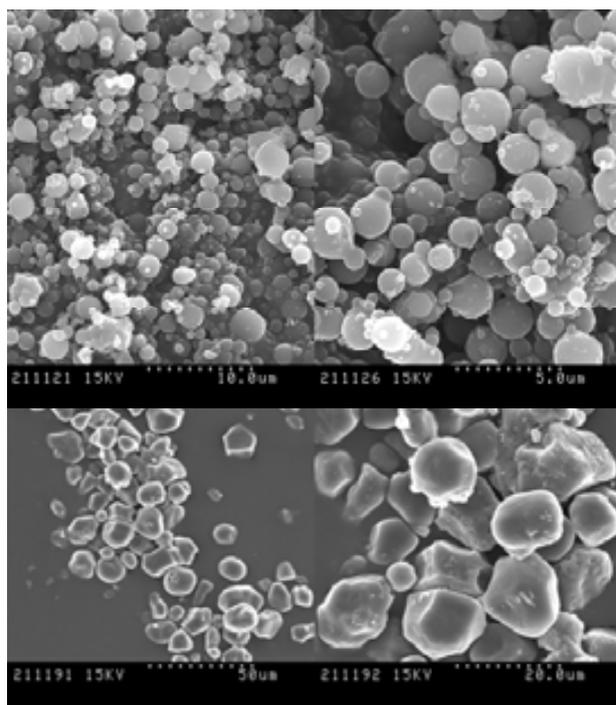
1. Un determinado volumen de disolución o dispersión del ibuprofeno en un disolvente orgánico convencional, con una sobresaturación inicial  $\beta_i$  a la temperatura  $T_w$ , se carga dentro del reactor de alta presión  $RI$ .
2. Un determinado volumen de agua se carga dentro del reactor  $RI$ , a la temperatura de trabajo  $T_w$ , hasta alcanzar una relación molar de agua/disolvente orgánico y la separación del soluto como fase sólida.
3. Activación del sistema de agitación durante 30 minutos para que se alcance el equilibrio térmico, y una completa homogeneización de la mezcla.
4. Adición de  $CO_2$  al reactor  $RI$ , mediante la apertura de las válvulas  $V2$  y  $V3$ , y la activación de la bomba  $PI$ , hasta formar una microemulsión estable a una presión  $P_{1w}$  y con un contenido en  $CO_2$  dentro del reactor de  $X_{CO_2(w)}$ .<sup>4</sup> Es importante destacar aquí, que en este punto el  $CO_2$  actúa como cosolvente del soluto a cristalizar y que la concentración de éste en la microemulsión debe estar por debajo de su límite de saturación ( $\beta < 1$ ). En esta etapa, conviene tener la agitación activada para aumentar la velocidad de mezclado entre el  $CO_2$  y la disolución o dispersión inicial.
5. Desconexión del sistema de agitación.
6. Presurización del reactor hasta la nueva presión de trabajo  $P_{2w}$ , en la cual se debe manifestar el carácter antisolvente del agua con la consecuente precipitación del soluto en forma de micro- y nanopartículas. Esta presurización puede realizarse mediante la adición de  $N_2$ , que actúa como un émbolo, mediante la apertura de las válvulas  $V1$  y  $V3$ .
7. Recolección de las partículas que se forman mediante la despresurización del sistema a la presión  $P_{2w}$ , sobre un filtro  $FI$  presurizado a  $P_{2w}$ , a través de la apertura de las válvulas  $V4$  y  $V5$ . En esta etapa se introduce una corriente de nitrógeno a la presión  $P_{2w}$  por la parte superior del reactor  $RI$ , con el objetivo de mantener la presión en el interior del reactor constante y empujar verticalmente su contenido durante la despresurización.

---

<sup>4</sup>  $X_{CO_2(w)} = \text{moles } CO_2 / (\text{moles } CO_2 + \text{moles disolvente})$ .

- Una vez finalizada la filtración, el secado del sólido se llevará a cabo mediante una corriente de CO<sub>2</sub> a temperatura ambiente y a una presión comprendida entre 3-6MPa.

Siguiendo el protocolo descrito y utilizando la configuración experimental representada en la Figura 5.19, se realizó la precipitación confinada del ibuprofeno mediante el proceso *PIWASP por compresión*. Para ello, se preparó una microemulsión o/w, formada a partir del sistema “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” a la presión de 10MPa y temperatura de 308K, con una relación molar de agua/acetona de  $R=70/30$ , un sobresaturación inicial de  $\beta_i=0,63$  y una fracción molar de  $X_{CO_2}=0,44$ . Después, se incrementó la presión del sistema desde 10 MPa hasta 15 MPa, lo que provocó la precipitación del ibuprofeno, el cual fue recogido a la presión de 15MPa a través de un elemento filtrante presurizado a 15MPa. Las partículas que se recogieron en el filtro se lavaron con CO<sub>2</sub> líquido a 4MPa.



**Figura 5.21.** Imágenes de SEM de partículas de ibuprofeno (arriba) obtenidas por el método *PIWASP por compresión* (arriba), y del compuesto comercial sin procesar (abajo).

El tamaño y distribución de tamaños de las partículas fueron determinados por microscopia electrónica de barrido siguiendo los procedimientos descritos en la Parte Experimental. La fase sólida recolectada en el filtro tenía una media de 940nm con una desviación estándar de 300nm. Asimismo se observó mediante microscopia SEM que las partículas presentaban una morfología esferoidal muy homogénea, en comparación

con las partículas de ibuprofeno del material de partida, que tenían formas poliédricas con tamaños de partícula entorno a 1700nm y una desviación típica de 214nm (ver Figura 5.21). El rendimiento global del proceso de precipitación fue del 20% en peso.

En principio, en este proceso de precipitación, las características finales de las partículas obtenidas no dependen de la eficacia de la agitación como ocurre en el caso de las técnicas convencionales de precipitación, sino del grado de distribución homogénea del agua en la microemulsión obtenida, que seguida de una variación de la presión, provoca que el agua actúe como antisolvente y tenga lugar la precipitación de las partículas sólidas. En el proceso *PIWASP por compresión*, el efecto anti-solvente del agua emerge homogéneamente sobre toda la disolución, causando un aumento homogéneo de la sobresaturación de la disolución en el espacio confinado de la fase discontinua, favoreciendo así el fenómeno de nucleación frente al crecimiento cristalino. Como consecuencia directa de lo descrito anteriormente, tal y como se observa en la Figura 5.21, este proceso de precipitación por compresión permite obtener partículas sólidas de ibuprofeno de estructura homogénea y con una relación de aspecto próxima a la unidad; es decir de morfología esferoidal. Esto último las hace muy útiles para aplicaciones donde la morfología de las partículas tiene una influencia decisiva para su aplicación.

### 5.3.2 Desarrollo metodológico del proceso *PIWASP por descompresión*

En la Figura 5.22 están esquematizadas las diferentes etapas que deben realizarse para llevar a cabo un proceso *PIWASP por descompresión*. Este proceso requiere en primer lugar preparar una mezcla de un disolvente orgánico, ibuprofeno y agua, y con ella obtener una microemulsión mediante la adición de CO<sub>2</sub> y el aumento de la presión del sistema hasta alcanzar una presión  $P_{1w}$  donde el valor de la sobresaturación del soluto es menor o igual que 1. A continuación, se disminuye la presión del sistema hasta alcanzar una presión de  $P_{2w}$ , tal que  $\Delta P < 0$  ( $\Delta P = P_{2w} - P_{1w}$ ), lo que permite modificar el efecto antisolvente del medio provocando la precipitación de partículas sólidas.

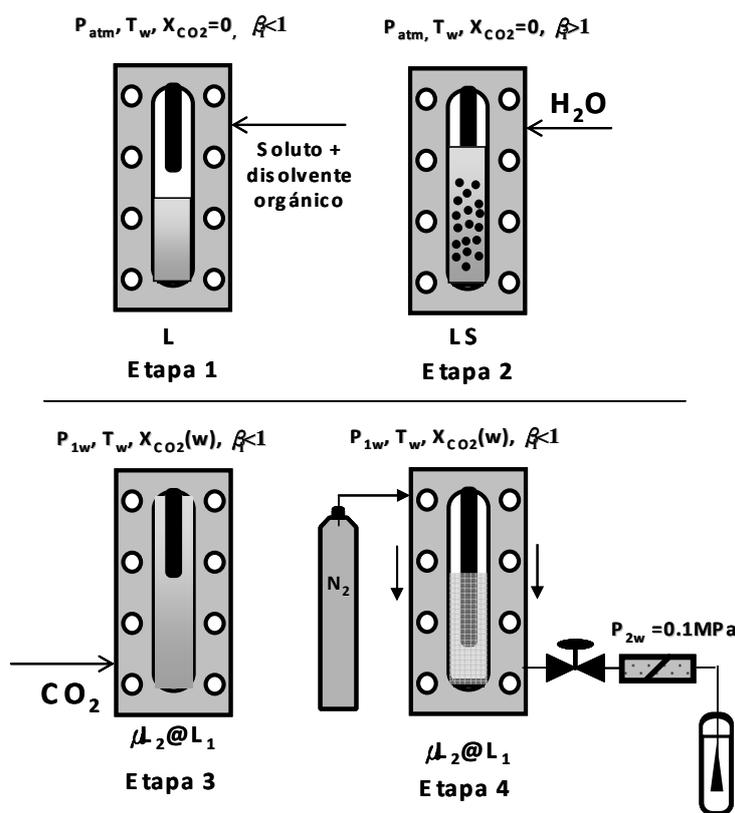


Figura 5.22. Secuencia de etapas del método PIWASP por descompresión.

El protocolo de operaciones que se diseñó para llevar a cabo la metodología PIWASP por descompresión esquematizada en la Figura 5.22, empleando la configuración experimental representada en la Figura 5.19, es el que se describe a continuación:

1. Un determinado volumen de disolución o dispersión del ibuprofeno en un disolvente orgánico convencional, con una sobresaturación inicial  $\beta_i$  a la temperatura  $T_w$ , se carga dentro del reactor de alta presión RI.
2. Un determinado volumen de agua se carga dentro del reactor RI, a la temperatura de trabajo  $T_w$ , hasta alcanzar una relación molar de agua/disolvente orgánico (R) y la separación del soluto como una fase sólida.
3. Activación del sistema de agitación durante 30 minutos para que se alcance el equilibrio térmico y una completa homogeneización de la mezcla.
4. Adición de  $CO_2$  al reactor RI, mediante la apertura de las válvulas V2 y V3, y la activación de la bomba PI, hasta formar una microemulsión estable a una

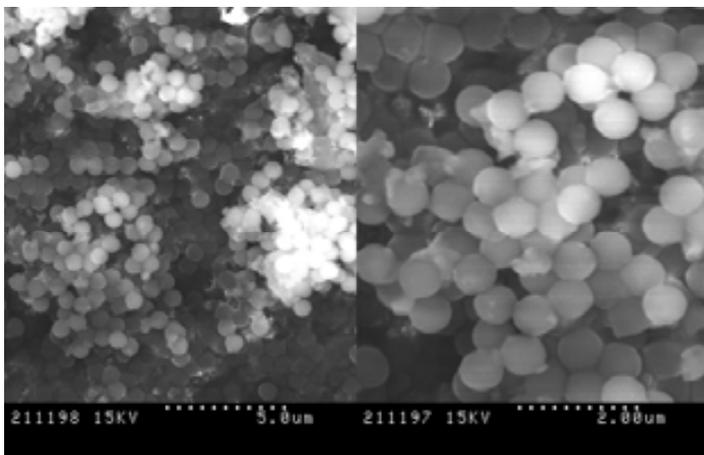
presión  $P_{1w}$  con un contenido en  $\text{CO}_2$  dentro del reactor de  $X_{\text{CO}_2(w)}$ .<sup>5</sup> Es importante destacar aquí, que en este punto el  $\text{CO}_2$  actúa como cosolvente del soluto a cristalizar y que la concentración de éste en la microemulsión debe estar por debajo de su límite de saturación ( $\beta < 1$ ). En esta etapa, conviene tener la agitación activada para aumentar la velocidad de mezclado entre el  $\text{CO}_2$  y la disolución o dispersión inicial.

5. Desconexión del sistema de agitación.
6. Reducción de la presión del reactor  $RI$  desde  $P_{1w}$  hasta presión atmosférica, mediante la apertura de la válvula  $V5$ . Durante dicha despresurización, se produce una evaporación del  $\text{CO}_2$  lo que provoca que el agua manifieste su carácter antisolvente, provocando la precipitación de partículas del soluto que serán recolectadas en el elemento filtrante  $F2$  a presión atmosférica. En esta etapa se introduce una corriente de nitrógeno a la presión  $P_{2w}$  por la parte superior del reactor  $RI$ , con el objetivo de mantener la presión en el interior del reactor constante y empujar verticalmente su contenido durante la despresurización.
7. Una vez finalizada la filtración, el secado del sólido se llevará a cabo mediante una corriente de  $\text{CO}_2$  a temperatura ambiente y a una presión comprendida entre 3-6MPa.

Siguiendo el protocolo descrito anteriormente y utilizando la configuración experimental representada en la Figura 5.19, se realizó la precipitación confinada del ibuprofeno mediante el proceso *PIWASP por descompresión*. Para ello, se preparó una microemulsión o/w, formada por “ibuprofeno/acetona/agua/ $\text{CO}_2$ ” a la presión de 10MPa y temperatura de 308K, con una relación molar de agua/acetona de  $R=70/30$ , un sobresaturación inicial de  $\beta_i=0,63$  y una fracción molar de  $X_{\text{CO}_2}=0,44$ . La despresurización de esta microemulsión provocó la precipitación del ibuprofeno, el cual fue recogido a presión atmosférica a través de un elemento filtrante. Las partículas que se recogieron en el filtro se lavaron con  $\text{CO}_2$  líquido a 4MPa. El tamaño y distribución de tamaños de las partículas fueron determinados por microscopía electrónica de barrido siguiendo los procedimientos descritos en la Parte Experimental. La fase sólida recolectada en el filtro tenía una media de 740nm con una desviación estándar de

<sup>5</sup>  $X_{\text{CO}_2(w)} = \text{moles } \text{CO}_2 / (\text{moles } \text{CO}_2 + \text{moles disolvente})$ .

100nm. (ver Figura 5.23). Asimismo se observó mediante SEM que las partículas presentaban una morfología esférica muy homogénea, en comparación con las partículas de ibuprofeno sin procesar (ver Figura 5.21). El rendimiento global del proceso de precipitación fue del 86% en peso.



**Figura 5.23.** Imágenes de SEM de partículas de ibuprofeno obtenidas por el método *PIWASP por compresión* ( $\Delta P < 0$ ).

En la metodología *PIWASP por descompresión* las características finales de las partículas obtenidas en principio no deben depender de la eficacia de la agitación, sino de la elevada homogeneidad con que se manifiesta el carácter antisolvente del agua sobre los nanodominios de disolución expandida con  $\text{CO}_2$ , al reducir la presión de la microemulsión. Como consecuencia directa de ello, tal y como se observa en la Figura 5.23, este proceso de precipitación confinada por descompresión también permite obtener partículas sólidas de ibuprofeno de estructura muy homogénea, y con una relación de aspecto próxima a la unidad, es decir de morfología esférica.

## 5.4 Comparación de las metodologías PIWASP y DELOS de precipitación desde disoluciones expandidas con CO<sub>2</sub>

En este punto del trabajo se creyó conveniente comparar la metodología PIWASP antes descrita con el método DELOS, también desarrollado en el grupo de trabajo. En un proceso de cristalización DELOS la adición de un fluido comprimido como el CO<sub>2</sub>, sobre una disolución orgánica que contiene el soluto a cristalizar genera una nueva disolución líquida expandida.<sup>(50)</sup> Esta nueva disolución líquida está constituida por el soluto disuelto en una mezcla “disolvente orgánico/CO<sub>2</sub>” a unas condiciones de presión,  $P_w$ , y temperatura,  $T_w$ . En este método el CO<sub>2</sub> no provoca la precipitación del soluto que se encuentra disuelto, sino que actúa como cosolvente. Cuando esta disolución a alta presión se despresuriza, el CO<sub>2</sub> se evapora, provocando un rápido y extremadamente homogéneo enfriamiento del sistema.<sup>(46)</sup> Este enfriamiento homogéneo genera una sobresaturación de igual magnitud en todos los puntos de la disolución, lo que provoca la precipitación de partículas cristalinas de tamaño micro- y/o nanométrico. De manera diferente, en un proceso PIWASP, la precipitación es promovida por la reestructuración que experimentan los nanodominios de disolvente expandido con CO<sub>2</sub> de una microemulsión o/w al modificar la presión del sistema. Esta reestructuración comporta que, la fase acuosa de la microemulsión pueda manifestar en mayor extensión su carácter antisolvente sobre el soluto inicialmente disuelto en los nanodominios, causando su precipitación.

Para comparar la eficiencia entre las metodologías PIWASP y DELOS, en el presente trabajo se realizaron experimentos con ambas metodologías para la preparación de micro- y nanopartículas de ibuprofeno, utilizando sistemas con las mismas proporciones de “ibuprofeno/disolvente orgánico/CO<sub>2</sub>” en todos los casos. Para ello se utilizó la configuración experimental y el protocolo de operaciones descritos en el Apartado 5.3. Para llevar a cabo el experimento *PIWASP por compresión*, se preparó una microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$  de “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” a la presión de 10MPa y temperatura de 308K, con una relación molar de agua/acetona de  $R=70/30$ , un sobresaturación inicial de  $\beta_i=0,63$  y una fracción molar de  $X_{CO_2}=0,44$ . Después, se incrementó la presión del sistema hasta 15 MPa, lo que provocó la precipitación del ibuprofeno, el cual fue recogido a la presión de 15MPa a través de un elemento filtrante presurizado a 15MPa. En el experimento *PIWASP por descompresión*, se preparó

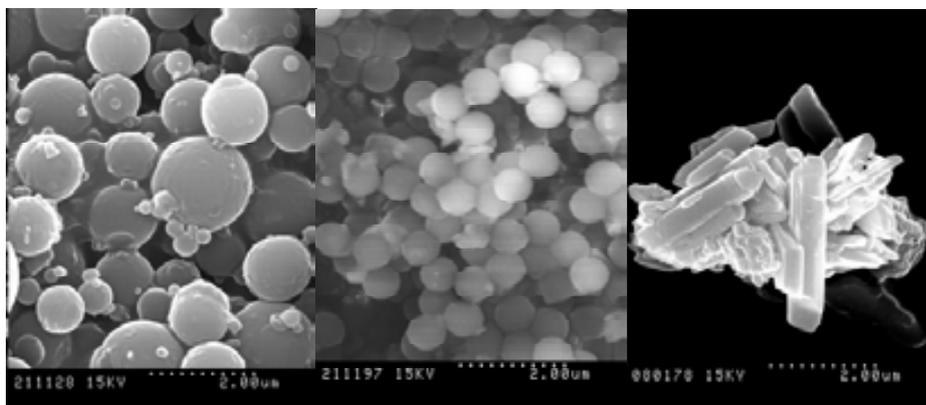
también una microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$  de “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” a la presión de 10MPa y temperatura de 308K, con una relación molar de agua/acetona de  $R=70/30$ , un sobresaturación inicial de  $\beta_i=0,63$  y una fracción molar de  $X_{CO_2}=0,44$ . La despresurización de esta microemulsión provocó la precipitación del ibuprofeno, el cual fue recogido a presión atmosférica a través de un elemento filtrante. Por otro lado, en el proceso DELOS se partió de una disolución de ibuprofeno en acetona expandida con CO<sub>2</sub> a la presión de 10MPa, con una sobresaturación inicial de  $\beta_i=0,63$  y una  $X_{CO_2}=0,44$ , para su posterior despresurización hasta presión atmosférica a través de un elemento filtrante.

En Tabla 5.3 se recogen los parámetros de operación, rendimientos y distribuciones de tamaño de partícula obtenidos en la precipitación del ibuprofeno mediante los procesos *PIWASP por compresión y descompresión* y DELOS.

**Tabla 5.3.** Experimentos para la obtención de partículas de ibuprofeno mediante las metodologías PIWASP y DELOS.

| Experimento | Método                   | P <sub>1w</sub> <sup>a</sup><br>(MPa) | P <sub>2w</sub> <sup>b</sup><br>(MPa) | Rendimiento <sup>c</sup><br>(%) | Tamaño                   |                   |
|-------------|--------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------|
|             |                          |                                       |                                       |                                 | D(0,5) <sup>d</sup> (nm) | D.S. <sup>e</sup> |
| DC-1        | PIWASP por compresión    | 10                                    | 14,7                                  | 20                              | 940                      | 300               |
| DC-3        | PIWASP por descompresión | 10                                    | 0,1                                   | 86                              | 740                      | 110               |
| DC-5        | DELOS                    | 10                                    | 0,1                                   | 98                              | 1480                     | 210               |

[a] Presión del sistema antes de la precipitación. [b] Presión del sistema después de la precipitación. [c] Rendimiento del proceso en % en peso. [d] Diámetro medio de partícula determinado por SEM. [e] Desviación estándar. [f] Condiciones de operación: T<sub>w</sub>=308K,  $\beta_i=0,63$ ,  $X_{CO_2}=0,44$ .



**Figura 5.24.** Imágenes de SEM de partículas de ibuprofeno obtenidas por la metodología *PIWASP por compresión* (izquierda), *PIWASP por descompresión* (centro) y DELOS (derecha).

Tal y como muestran los resultados de la Tabla 5.3, las partículas de ibuprofeno obtenidas por la metodología basada en microemulsiones expandidas con CO<sub>2</sub>, PIWASP, muestran unas distribuciones de tamaños de partícula con una media de 940 y 740nm respectivamente. Dicho valor medio es muy inferior al observado en las partículas precipitadas por el método DELOS que presentan una media de 12.8µm. Esta diferencia en las distribuciones de tamaños de partícula confirma que la precipitación confinada de partículas dentro de emulsiones expandidas con CO<sub>2</sub>, permite un mayor control de los procesos de nucleación y crecimiento cristalino, gobernados, en este caso, por el efecto antisolvente ejercido por el agua a nivel molecular al variar la presión del sistema. Asimismo, se observó mediante SEM que las partículas precipitadas por el proceso PIWASP, presentan una morfología homogénea esferoidal en comparación con aquellas partículas precipitadas por DELOS, que presentan formas tipo prismático (Figura 5.24).<sup>(51)</sup> Esta destacada diferencia también es atribuible al distinto control de los procesos de nucleación y crecimiento en esos procesos de precipitación.

## **5.5 Influencia de la presencia de un tensoactivo en la precipitación confinada del ibuprofeno mediante el proceso PIWASP**

Es bien conocido que la presencia de tensoactivos puede tener una influencia muy notable en las microemulsiones o/w en general y en todos aquellos procesos en los que intervienen dichas microemulsiones. Por ello se creyó oportuno evaluar la influencia de tensoactivos neutros en el proceso PIWASP. En este apartado se describen los experimentos y estudios realizados con ese objetivo empleando sistemas “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” en presencia de tensoactivos. Para ello se seleccionó como tensoactivo el PEG6000 que, basándonos en las observaciones descritas en el Capítulo 4, influye en la preparación de microemulsiones o/w de tipo  $\mu(L_2@L_1)$  con el sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” variando el rango de fracción molar de CO<sub>2</sub> en el cual se forma dichas microemulsiones.

### 5.5.1 Formación de microemulsiones o/w formadas por “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” en presencia de PEG6000

Antes de estudiar la influencia de un tensoactivo en la precipitación del ibuprofeno mediante el método PIWASP, se creyó oportuno estudiar el comportamiento de fases en el sistema “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” en presencia de PEG6000, bajo determinadas condiciones de presión, temperatura y composición, de forma análoga a como se había realizado con sistemas “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” libres de PEG6000 (ver Apartado 5.2.1). Este estudio se realizó, utilizando el analizador de fases y el protocolo de operaciones descritos en el Capítulo 4 y en la Parte Experimental. Ahora bien, en este caso, en lugar de disolventes puros, acetona y agua, se adicionaron a la celda de volumen variable disoluciones de ibuprofeno en acetona y de PEG6000 en agua para formar los sistemas “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>/PEG6000” deseados. Todos los experimentos se realizaron a 308K. Mediante inspección visual, a través de la mirilla de la celda de volumen variable (Figura 5.26), y medidas de densidad óptica (Figuras 5.25 y 5.27) se caracterizó la evolución de la composición de fases del sistema “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>/PEG6000” variando el contenido en CO<sub>2</sub> y la presión. Para poder facilitar el análisis del sistema por inspección visual, se empleó una pequeña cantidad (0,5mg) del colorante rojo Nilo disuelto en la acetona. Las variaciones de densidad óptica ( $OD_{\lambda}$ ) del sistema se realizaron mediante la medida de la absorción visible a  $\lambda=500\text{nm}$ , longitud de onda en la cual ninguno de los componentes absorbe.

Los resultados obtenidos que se reúnen en la Tabla 5.4 muestran que el sistema “ibuprofeno/acetona/agua” en presencia de PEG6000 con  $R=70/30$  y  $\beta=0,63$  (Punto 1 – Tabla 5.4), está formado por una fase sólida (S) de ibuprofeno y una fase líquida L, que es de color rosa debido a la presencia del colorante rojo Nilo, lo que indica que está constituida por una mezcla de acetona y agua. El valor de la densidad óptica de 2,73 de este sistema, es consecuencia de la luz dispersada por las partículas de ibuprofeno suspendidas (Punto 1 - Tabla 5.4 y Figuras 5.25 y 5.26). Al adicionar progresivamente CO<sub>2</sub>, se observa una desaparición paulatina de la fase sólida disminuyendo la turbidez del sistema y el valor de la densidad óptica, hasta que el sistema se transforma en una sola fase transparente de color rosado a  $X_{\text{CO}_2}=0,39$ . El valor de la  $OD_{\lambda}$  en estas condiciones es ligeramente superior a 0 (Punto 7 – Tabla 5.4 y Figura 5.25), lo que indica que el sistema posee una cierta estructura a nivel nanoscópico formando una microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$ . Entre  $X_{\text{CO}_2}=0,39$  y  $X_{\text{CO}_2}=0,45$  (Puntos 7 y 8 – Tabla 5.4), el

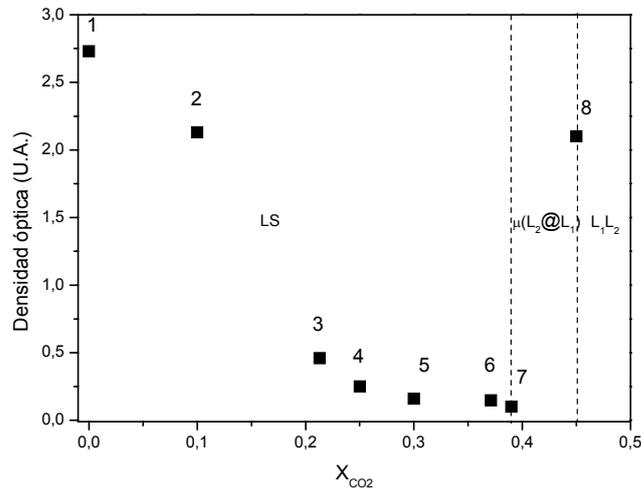
sistema se mantiene como microemulsión estable, en la que el ibuprofeno se encuentra totalmente disuelto.

**Tabla 5.4.** Análisis de las fases del sistema “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>/PEG6000” a T=308K, P=10MPa, R=70/30, β=0,63 y diferentes contenidos de CO<sub>2</sub>.

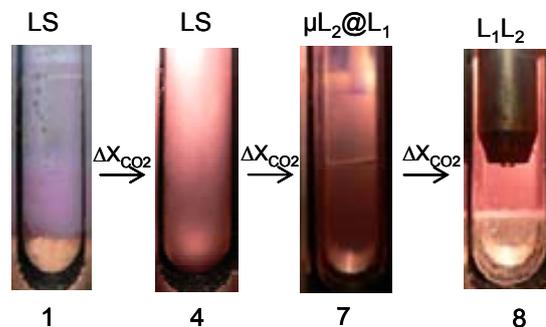
| Punto | X <sub>CO<sub>2</sub></sub> <sup>a</sup> | Inspección visual | Color             | O.D. <sup>b</sup> | Fases <sup>c</sup>                 |
|-------|--|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------------------|
| 1     | 0  | Turbio            | Rosado            | 2,73              | LS                                 |
| 2     | 0,10                                     | Turbio            | Rosado            | 2,13              | LS                                 |
| 3     | 0,21                                     | Turbio            | Rosado            | 0,46              | LS                                 |
| 4     | 0,25                                     | Turbio            | Rosado            | 0,25              | LS                                 |
| 5     | 0,30                                     | Turbio            | Rosado            | 0,16              | LS                                 |
| 6     | 0,37                                     | Turbio            | Rosado            | 0,15              | LS                                 |
| 7     | 0,39                                     | Transparente      | Rosado            | 0,10              | μ(L <sub>2</sub> @L <sub>1</sub> ) |
| 8     | 0,45                                     | Separación        | Rosado + Incoloro | 2,10              | L <sub>1</sub> L <sub>2</sub>      |

[a] X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=moles CO<sub>2</sub>/(moles CO<sub>2</sub>+moles acetona). [b] Densidad óptica. [c] Fases observadas en el sistema: L, una sola fase líquida rica en acetona y agua; S: sólido; L<sub>1</sub>: fase acuosa; L<sub>2</sub>: fase orgánica; μ(L<sub>2</sub>@L<sub>1</sub>), microemulsión; L<sub>1</sub>L<sub>2</sub>, dos fases líquidas separadas.

[d] Concentración de PEG6000=1.63M.



**Figura 5.25.** Estudio de la evolución de la densidad óptica a λ=500nm del sistema “ibuprofeno/acetona/H<sub>2</sub>O/CO<sub>2</sub>/PEG6000” con una composición de R=70/30 y β=0,63, a la temperatura de 308K y la presión de 10MPa, en función la fracción molar de X<sub>CO<sub>2</sub></sub>.



**Figura 5.26.** Imágenes de la evolución del sistema “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>/PEG6000” con R=70/30, β=0,63, P=10MPa y T=308K, al variar el contenido en CO<sub>2</sub>. La transición entre los puntos 1→4→7→8 es debida a incrementos progresivos en la X<sub>CO<sub>2</sub></sub> (ver Tabla 5.4).

Si sobre el sistema anterior (Punto 7- Tabla 5.4 y Figura 5.26) se sigue adicionando más  $\text{CO}_2$ , se observa de nuevo un aumento de la turbidez y del valor de la  $OD_\lambda$ , hasta que se produce una separación total de las fases a  $X_{\text{CO}_2}=0,54$ , y el sistema se escinde o se rompe en dos fases líquidas transparentes ( $L_1L_2$ ), separadas por una sola interfase (Punto 8- Tabla 5.4 y Figura 5.26). La fase más densa, que se observa en la parte inferior de la celda, es rica en agua,  $L_1$ , tal y como se deduce de la ausencia de una coloración, debido al colorante rojo Nilo insoluble en agua. En cambio, la fase menos densa en la parte superior de la celda, tiene una coloración rosada debido a la presencia del colorante, lo que indica que es una fase líquida rica en acetona y  $\text{CO}_2$ . Estas observaciones confirman que la adición de  $\text{CO}_2$  sobre una mezcla “ibuprofeno/acetona/agua/PEG6000” constituida por una fase líquida y una fase sólida, conduce, bajo ciertas condiciones de presión, temperatura y composición, a la formación de microemulsiones o/w de tipo  $\mu(L_2@L_1)$ , en las que los nanodominios de acetona expandida con  $\text{CO}_2$  en los que se encuentra disuelto el ibuprofeno ( $L_2$ ) están dispersos en un medio rico en agua ( $L_1$ ). El tensoactivo probablemente se encuentra distribuido entre ambas fases  $L_1$  y  $L_2$ . Asimismo, se observó que el sistema “ibuprofeno/acetona/agua/ $\text{CO}_2$ ” en presencia de PEG6000 a la presión de 10MPa y a la temperatura de 308K, con  $R=70/30$  y  $\beta=0,63$  empieza a formar microemulsiones estables a un valor de  $X_{\text{CO}_2}$  inferior al observado en ausencia del tensoactivo. Esto es probablemente debido a que el tensoactivo es capaz de disminuir los requerimientos energéticos necesarios para formar la microemulsión.

### **5.5.2 Efecto de la variación de la presión sobre microemulsiones o/w formadas por “ibuprofeno/acetona/agua/ $\text{CO}_2$ ” en presencia de PEG6000**

A continuación se estudió el efecto que tenía la presión sobre la microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$  obtenida a una  $X_{\text{CO}_2}=0,39$  descrita en el apartado anterior, en la cual el ibuprofeno y el PEG6000 se encuentran totalmente disueltos. Así, al variar la presión sobre el sistema (Punto 1 – Tabla 5.5) se observa que en todo el rango de presiones que va desde 8MPa (Punto 1 – Tabla 5.5) hasta 10MPa (Punto 2 – Tabla 5.5) el valor de la densidad óptica se mantiene por debajo de  $OD_\lambda < 0,4$ , indicando que el sistema sigue formado por una microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$  estructurada a nivel nanoscópico (ver Figura 5.27). Al seguir aumentando la presión, se observa que el valor de la densidad óptica sufre un aumento brusco (Figura 5.25), desde 0,12 a 10MPa (Punto 2 – Tabla 5.5) hasta

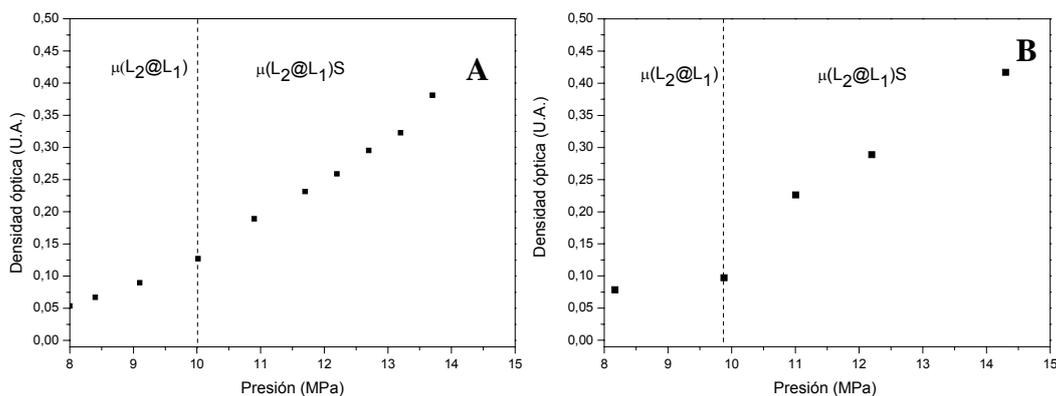
alcanzar un valor de 0,32 a 13,2 MPa (Punto 3 – Tabla 5.5), coincidiendo con un cambio del aspecto visual del sistema que pase de transparente a turbio (Figura 5.28) y que, por tanto, es indicativo de que se ha producido un cambio estructural en el sistema. En la gráfica de la Figura 5.27 se observa también que al aumentar de nuevo la presión del sistema hasta 13,7 MPa la  $OD_\lambda$  alcanza un valor máximo de 0,38.

**Tabla 5.5.** Análisis de fases del sistema “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>/PEG6000” a T=308K, X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=0,44, R=70/30, β=0,63, al someterlo a cambios de presión.

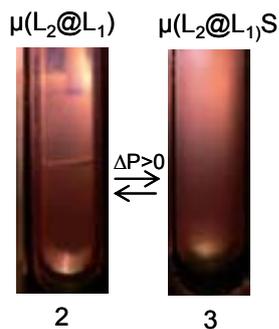
| Punto | P(MPa) <sup>a</sup> | Inspección visual | Color  | O.D. <sup>b</sup> | Fases <sup>c</sup> |
|-------|---------------------|-------------------|--------|-------------------|--------------------|
| 1     | 8                   | Transparente      | Rosado | 0,05              | $\mu(L_2@L_1)$     |
| 2     | 10                  | Transparente      | Rosado | 0,12              | $\mu(L_2@L_1)$     |
| 3     | 13,2                | Turbio            | Rosado | 0,32              | $\mu(L_2@L_1)S$    |
| 4     | 13,7                | Turbio            | Rosado | 0,38              | $\mu(L_2@L_1)S$    |

[a] Presión del sistema. [b] X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=moles CO<sub>2</sub>/(moles CO<sub>2</sub> + moles acetona). [c] Densidad óptica. [d] Fases observadas en el sistema: S: sólido; L<sub>1</sub>: fase acuosa; L<sub>2</sub>: fase orgánica;  $\mu(L_2@L_1)$ , microemulsión. Concentración de PEG6000=1,61M.

Al igual que se describió en el Apartado 5.2.2, estos aumentos de la densidad óptica y turbidez observados conforme se aumenta la presión del sistema están estrechamente ligados con la precipitación confinada de partículas sólidas de ibuprofeno (S) dentro de la microemulsión  $\mu(L_2@L_1)$  que dispersan la luz. También se observa que este proceso de precipitación es también reversible en presencia del PEG6000, ya que una disminución de la presión de 13,7MP a 8MPa, se traduce en la redisolución total del ibuprofeno precipitado a alta presión, disminuyendo la turbidez y  $OD_\lambda$  del sistema.



**Figura 5.27.** Estudio de la evolución de la densidad óptica a  $\lambda=500\text{nm}$  de sistemas “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” en función de la presión del sistema. (A) Sistema en presencia de PEG6000 compuesto por R=70/30, β=0,63, X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=0,44 y T=308K y (B) Sistema sin PEG6000 compuesto por R=70/30, X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=0,26 y T=308K.



**Figura 5.28.** Imágenes de la evolución del sistema “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>/PEG6000” con  $R=70/30$ ,  $\beta=0,63$ ,  $X_{CO_2}=0,44$  y  $T=308K$ , al variar la presión. La transición entre los puntos 2→3 es debida a un incremento en la presión (ver Tabla 5.5).

Por lo tanto, en base a los resultados observados por inspección visual y las medidas de densidad óptica, se puede decir que la presencia del tensoactivo PEG6000 no altera ni interfiere significativamente la formación de microemulsiones o/w formada por “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>”, ni sobre el efecto de la variación de la presión sobre dichas microemulsiones para la precipitación confinada del ibuprofeno por *PIWASP*.

### 5.5.3 Precipitación de partículas de ibuprofeno en presencia de PEG6000 con la metodología *PIWASP por compresión y descompresión*

Para estudiar la influencia de la presencia del tensoactivo PEG6000 en la precipitación confinada de ibuprofeno mediante las metodologías *PIWASP por compresión y descompresión*, se realizaron dos experimentos utilizando la configuración experimental y el protocolo de operaciones descritos en el Apartado 5.3.

Para ello, inicialmente en ambos casos se preparó una microemulsión o/w, formada por “ibuprofeno/acetona/agua/CO<sub>2</sub>” a la presión de 10MPa y temperatura de 308 K, con una relación molar de agua/acetona de  $R=70/30$ , un sobresaturación inicial de  $\beta_i=0,63$ , una fracción molar de  $X_{CO_2}=0,39$  y una concentración de PEG6000 de 1,61 M. Siguiendo un proceso *PIWASP por compresión*, se incrementó la presión del sistema desde 10MPa hasta 15MPa, lo que también provocó la precipitación del ibuprofeno, el cual fue recogido a la presión de 15MPa a través de un elemento filtrante presurizado a 15MPa. En cambio, en el *PIWASP por descompresión*, se redujo la

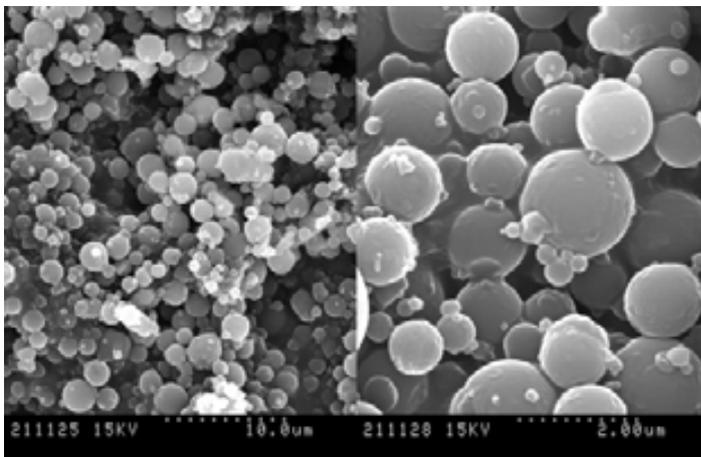
presión del sistema desde 10MPa hasta presión atmosférica, lo que provocó la precipitación del ibuprofeno, el cual fue recogido a presión atmosférica a través de un elemento filtrante. En ambos casos las partículas que se recogieron se lavaron con CO<sub>2</sub> líquido a 4MPa. En Tabla 5.6 están recogidos los parámetros de operación, rendimientos y distribuciones de tamaño de partícula obtenidos para la precipitación de ibuprofeno con PEG6000 mediante la metodología PIWASP.

**Tabla 5.6.** Experimentos para la obtención de partículas de ibuprofeno mediante la metodología *PIWASP* por compresión y descompresión en presencia de PEG6000.

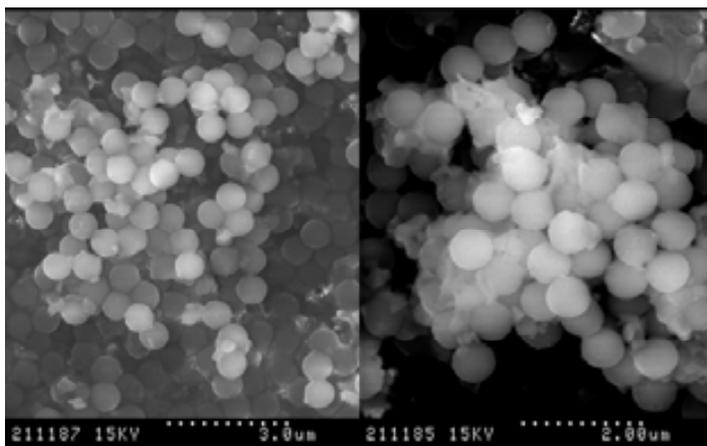
| Experimento | Método                   | P <sub>1w</sub> <sup>a</sup><br>(MPa) | P <sub>2w</sub> <sup>b</sup><br>(MPa) | Rendimiento <sup>c</sup><br>(%) | Tamaño                   |                   |
|-------------|--------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------|
|             |                          |                                       |                                       |                                 | D(0,5) <sup>d</sup> (nm) | D.S. <sup>e</sup> |
| DC-6        | PIWASP por compresión    | 10                                    | 14,7                                  | 21                              | 860                      | 460               |
| DC-7        | PIWASP por descompresión | 10                                    | 0,1                                   | 81                              | 680                      | 10                |

[a] Presión del sistema antes de la precipitación. [b] Presión del sistema después de la precipitación. [c] Rendimiento del proceso en % en peso. [d] Diámetro medio de partícula determinado por SEM. [e] Desviación estándar. [f] Condiciones de operación: T<sub>w</sub>=308K, β<sub>i</sub>=0,63, X<sub>CO<sub>2</sub></sub>=0,44, Concentración de PEG6000=1,61M.

Tal y como se muestra en la Tabla 5.6, las partículas de ibuprofeno obtenidas con PEG6000 mediante el método PIWASP por compresión y descompresión, muestran distribuciones de tamaños de partícula inferiores a las observadas en partículas de ibuprofeno precipitadas sin tensoactivo en la mismas condiciones (ver Tabla 5.3) Asimismo se observó mediante SEM que dichas partículas de ibuprofeno presentan una morfología esferoidal muy homogénea y similar a la observada en su ausencia (Figuras 5.29 y 5.30).



**Figura 5.29.** Imágenes de SEM de partículas de ibuprofeno obtenidas por *PIWASP* por compresión en presencia de PEG6000.



**Figura 5.30.** Imágenes de SEM de partículas de ibuprofeno obtenidas mediante *PIWASP por descompresión* en presencia de PEG6000.

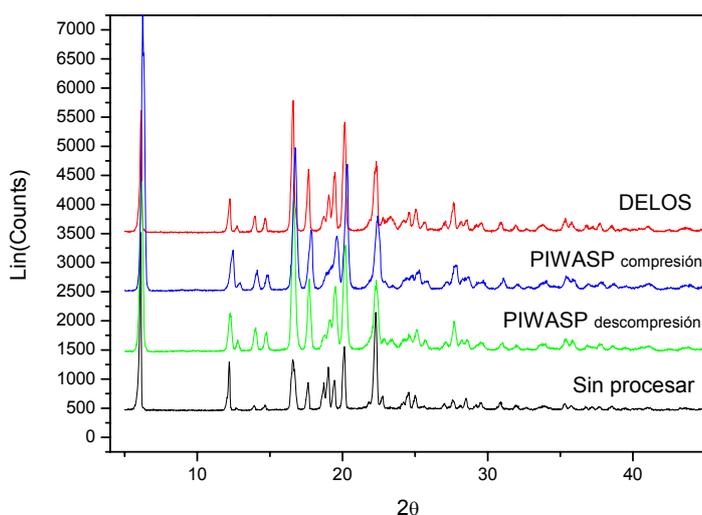
La mejora sustancial observada en la distribución de tamaños de partícula del ibuprofeno cuando se añade un tensoactivo en la fase acuosa, en un proceso PIWASP podría atribuirse a que el tensoactivo interviene en el proceso de estabilización de las partículas una vez formadas en el seno de la microemulsión, limitando el crecimiento y agregación de las mismas. Así pues, el tensoactivo actuaría como ligando estabilizante de las partículas, inhibiendo la agregación entre ellas, mediante su adsorción en su superficie, y favoreciendo así la obtención de tamaños de partícula todavía más pequeños y distribuciones de tamaño más estrechas.<sup>(52),(53)</sup>

## **5.6 Análisis de la cristalinidad de las partículas de ibuprofeno obtenidas por PIWASP**

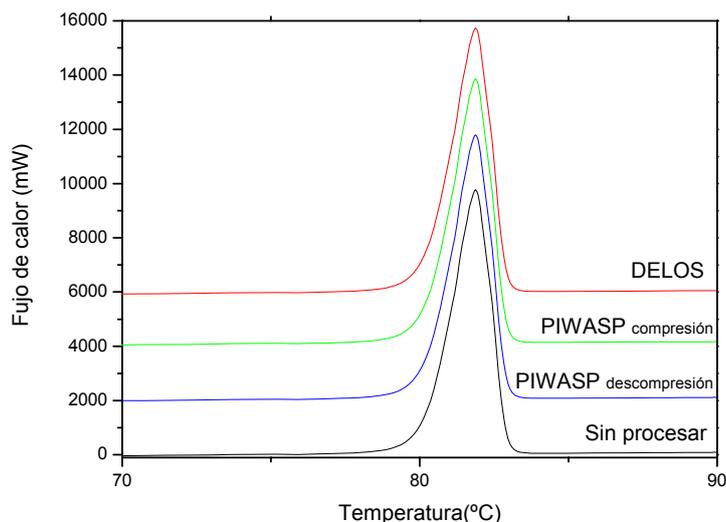
El grado de cristalinidad de un fármaco es un factor de gran importancia, ya que las formulaciones que contienen sólidos con formas amorfas son menos estables que los sólidos cristalinos y, por tanto, conllevan un mayor riesgo en cuanto a su conservación durante el almacenamiento. Además, los compuestos parcial o totalmente amorfos tienen a menudo una mayor reactividad, presentan una gran inestabilidad frente al estrés mecánico y térmico y son muy sensibles a la absorción de agua. La morfología y las características superficiales de las partículas sólidas de un fármaco son también de suma importancia a la hora de definir su comportamiento durante su formulación o posterior procesado. Asimismo, la cristalinidad es también un punto clave a la hora de evaluar la viabilidad de aplicar un determinado proceso de cristalización a un determinado

compuesto, ya que en algunos casos el propio procesado del material conlleva una pérdida significativa de cristalinidad.

Debido a las condiciones anteriores se creyó oportuno estudiar el grado de cristalinidad de las partículas de ibuprofeno precipitadas mediante los procesos *PIWASP por compresión y descompresión*, así como por DELOS. Dicho estudio se realizó analizando los difractogramas de rayos X en polvo (XRPD) y mediante medidas de calorimetría diferencial por barrido (DSC) de las muestras obtenidas en los experimentos DC-1, DC-3 y DC-5. Tal y como se puede observar en el Figura 5.31, los picos de los perfiles de difracción de rayos X obtenidos para cada uno de los sólidos preparados por PIWASP y DELOS, son idénticos en cuanto a la posición y la intensidad relativa de los picos del difractograma del material sin procesar. Por lo tanto, se puede decir que el procesado del material en las condiciones empleadas, produjo siempre la misma forma polimórfica cristalina que la del material de partida. Así pues las partículas de ibuprofeno presentan una estructura cristalina del tipo sistema monoclinico, con un grupo espacial de simetría  $P2_1/c$ , similar a la descrita en la bibliografía.<sup>(55)</sup> Además, de estos difractogramas de rayos X también se deduce que los precipitados PIWASP y DELOS presentan un elevado grado de cristalinidad, similar al del compuesto de partida.<sup>(54)</sup>



**Figura 5.31.** Difractograma de rayos X en polvo correspondientes a partículas de ibuprofeno precipitadas por los procesos DELOS y PIWASP y del compuesto de partida.



**Figura 5.32.** Perfiles de DSC medidos a una velocidad de barrido de 5°C/min de partículas de ibuprofeno precipitadas por los procesos DELOS y PIWASP y del compuesto de partida.

La cristalinidad de las partículas de ibuprofeno del compuesto de partida y las obtenidas mediante los procesos PIWASP y DELOS, también se analizó mediante la técnica de calorimetría diferencial por barrido. En la Figura 5.32, se muestran los perfiles donde se observa la presencia de un único pico de fusión endotérmico a una temperatura de 82°C, coincidente en los cuatro perfiles de DSC estudiados, indicando la elevada pureza de las muestras procesadas.

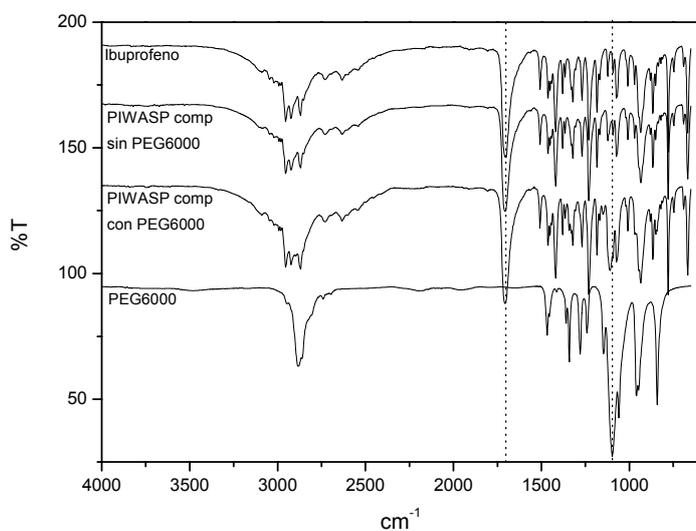
Por lo tanto, se puede concluir que la metodología PIWASP permite obtener partículas cristalinas de ibuprofeno con un elevado grado de pureza polimórfica y estabilidad termodinámica.

### 5.6.1. Influencia de la presencia de un tensoactivo sobre la cristalinidad de partículas obtenidas por PIWASP

En este apartado, se describe la influencia de la presencia del tensoactivo, PEG6000, sobre la cristalinidad de las partículas de ibuprofeno obtenidas mediante la metodología *PIWASP por compresión*. Para ello, se analizaron los sólidos obtenidos en los experimentos DC1 y DC-6 descritos en el Apartado 5.5, mediante las técnicas de espectroscopia de infrarrojo (IR-ATR), difracción de rayos X en polvo, y calorimetría diferencial por barrido.

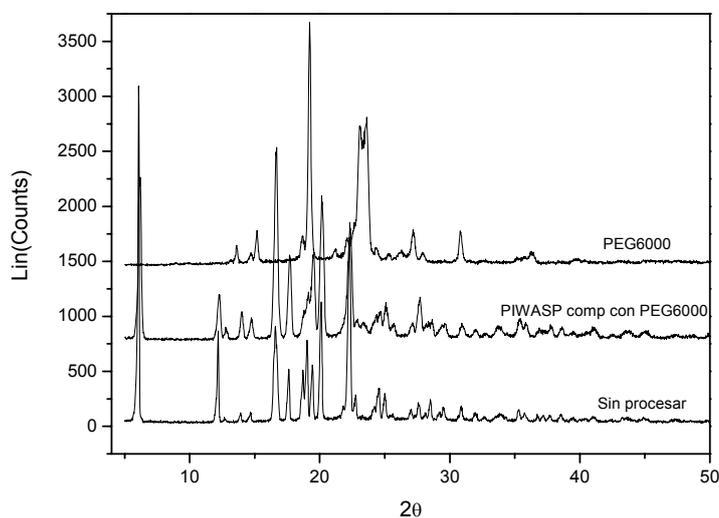
La composición de las partículas precipitadas de ibuprofeno en presencia de PEG6000, mediante el proceso *PIWASP por compresión*, se analizaron por espectroscopia de infrarrojo por reflexión total atenuada (IR-ATR). Tal y como se puede ver en la Figura 5.33, el espectro del ibuprofeno puro presenta una banda intensa

bien definida a  $1700\text{cm}^{-1}$ , correspondiente al carbonilo del grupo ácido, y otra banda no tan bien definida a  $3000\text{cm}^{-1}$ . Asimismo, el PEG6000 puro presenta tres bandas, a 3300, 2800 y  $1100\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a los enlaces O-H, C-H de los grupos  $\text{OC}_2\text{H}_5$ , y C-O, respectivamente.<sup>(57)</sup> El espectro de las partículas de ibuprofeno precipitadas en presencia de PEG6000 presentan las absorciones características ibuprofeno y del PEG6000, no observándose desplazamientos significativos en las posiciones de los picos respecto a los compuestos puros. Este resultado indica la presencia del PEG6000 en las partículas de ibuprofeno, y además sugiere la ausencia de una posible interacción entre el PEG6000 y el ibuprofeno en estado sólido.



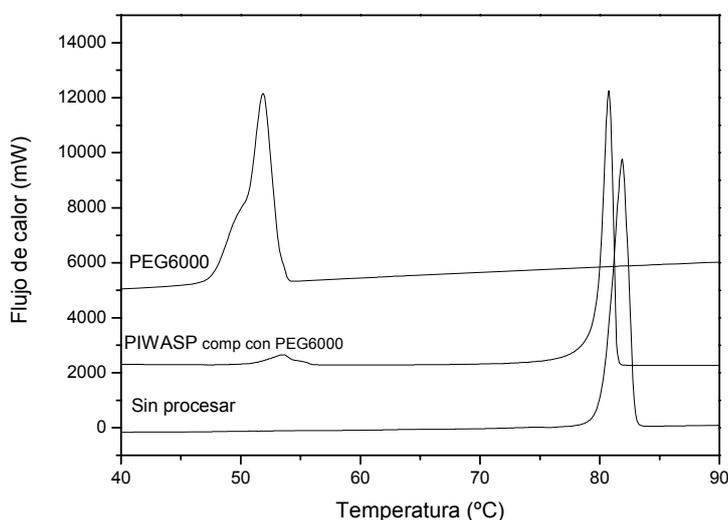
**Figura 5.33.** Espectros de FTIR del compuesto PEG6000, de partículas de ibuprofeno precipitadas por *PIWASP por compresión* con o sin PEG6000 y del compuesto de partida.

Tal y como se puede observar en la Figura 5.33, los picos de los perfiles de difracción de rayos X obtenidos para el sólido precipitadas por *PIWASP por compresión* en presencia de PEG6000, son idénticos en posición y en intensidad relativa a la que presenta el ibuprofeno de partida. Por lo tanto, se puede concluir que la presencia del tensoactivo PEG6000 no altera significativamente la cristalinidad de las partículas de ibuprofeno obtenidas.



**Figura 5.34.** Difractogramas de rayos X correspondientes al compuesto PEG6000, a las partículas de ibuprofeno precipitadas por *PIWASP por compresión* con PEG6000 y al compuesto de partida.

La cristalinidad de las partículas de ibuprofeno obtenidas con PEG6000 por PIWASP, también se analizaron mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (ver Figura 5.34). Mediante esta técnica se observa que el PEG6000 presenta dos picos de fusión endotérmicos a las temperaturas de 53, 55 °C, debido a dos formas cristalinas distintas del PEG6000. En cambio, el ibuprofeno precipitado puro presenta un pico a 82 °C que corresponde a su punto de fusión. Este último pico de fusión se encuentra desplazado hacia temperaturas algo inferiores (80,76°C) en el caso del ibuprofeno procesado por *PIWASP por compresión* en presencia del PEG6000. Este hecho puede atribuirse a la presencia del PEG6000, bien absorbido en la superficie del ibuprofeno o dentro de la partícula lo que alteraría la cohesividad del sólido ligeramente.<sup>(56)</sup>



**Figura 5.35.** Perfiles de DSC medidos a una velocidad de barrido de 5°C/min del compuesto PEG6000, y de las partículas de ibuprofeno precipitadas por *PIWASP por compresión* con PEG6000 y del compuesto de partida.

## 5.7 Conclusiones

- ☒ La adición de CO<sub>2</sub> sobre una mezcla “ibuprofeno/acetona/agua” conduce, bajo determinadas condiciones de presión, temperatura y composición, a la formación de microemulsiones  $\mu(L_2@L_1)$  termodinámicamente estables, cuya fase dispersa (L<sub>2</sub>) está constituida por una disolución de ibuprofeno en acetona expandida con CO<sub>2</sub>, y la fase continua (L<sub>1</sub>) por un medio acuoso.
- ☒ Se ha comprobado que la variación de la presión sobre dichas microemulsiones  $\mu(L_2@L_1)$ , promueve que el agua manifieste un efecto

antisolvente sobre el ibuprofeno disuelto en nanodominios de  $L_2$ , provocando la precipitación confinada de partículas sólidas de ibuprofeno.

- ☒ Se ha desarrollado la nueva metodología de precipitación, denominada PIWASP (*Pressure Induced Water Anti-Solvent Precipitation*), que utiliza microemulsiones expandidas con  $CO_2$  y se puede llevar a cabo tanto por compresión ( $\Delta P > 0$ ) como por descompresión ( $\Delta P < 0$ ) del sistema.
- ☒ Los procesos PIWASP permiten obtener en una sola etapa partículas de ibuprofeno cristalinas con una morfología esférica y poseen una estructura muy homogénea en tamaño que es superior a la obtenida por DELOS, bajo condiciones de operación similares.
- ☒ La utilización del tensoactivo PEG6000 en el proceso PIWASP permite obtener nanopartículas de ibuprofeno con tamaños medios de partícula más pequeños y distribuciones de tamaño más estrechas, que en ausencia de éste.

## 5.8 Referencias

- (1) (a) Smola, M.; Vandamme, T.; Sokolowski, A. *Int. J. Nanomedicine* 2008, 1, 1. (b) Chow, A.H.L.; Tong, H.H.Y.; Chattopadhyay, P.; Shekunov, B.Y., *Pharm. Res.* **2007**, 24, 3, 411.
- (2) Rasenack, N.; Müller, B.W. *Pharm. Dev. Technol.* **2004**, 9, 1, 1.
- (3) Pathak, P.; Meziani, M.J.; Desai, T.; Sun, Y-P. *J. Am Chem. Soc* **2004**, 126, 10842.
- (4) Möschwitzer, J.; Achleitner, G.; Pomper, H.; Müller, R.H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, 58, 615.
- (5) Kocbek, P.; Baumgartner, S.; kristl, J. *Int. J. Pharm.* **2006**, 312, 179.
- (6) (a) Rabinow, B.E.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, 3, 785. (b) Merisko-Liversidge, E., *Pharm. Res.* **1996**, 13, 272. (c) Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G.; Cooper, E., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2003**, 18, 113. (d) Muller, R.H.; Peters, K., *Int. J. Pharm.* **1998**, 160, 229.
- (7) Müller, R.H.; Becker, R.; Kruss, B.; Peters K. Patent USA nº 5858410 **1998**.
- (8) Sarkari, M.; Brown, J.; Chen, X.; Swinnea, S.; Williams, R.O.; Johnston, K.P., *Int. J. Pharm.* **2002**, 243, 17.
- (9) (a) Parrot, E.L. Comminution. In *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Decker Inc., New York, 1990, 3, 101. (b) Shalaev, E.; Shalaeva, M.; Zografí, G. *J. Pharm. Sci.* **2002**, 91, 584. (c) Waltersson, J.-O.; Lundgren, P. *Acta Pharm. Sue.* **1985**, 22, 291.
- (10) Horn, D.; Rieger, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4330.
- (11)  $\beta$  is the ratio between the actual concentration ( $C$ ) and the saturation concentration or solubility ( $C_s$ ) of the solute to crystallize.
- (12) Kashchiev, D.; *Nucleation: Basic theory with applications*, Butterworth-Heinemann, Oxford **2000**.
- (13) Shchukin, D.G.; Sukhorukov, G.B. *Adv. Mater.* **2004**, 16, 8, 671.
- (14) (a) Sjostrom, B; Kronberg, B.; Carlfors, J., *J. Pharm. Sci.* **1993**, 82, 579. (b) Trotta, M.; Gallarate, M.; Carlotti, M.E.; Morel, S., *J. Pharm. Sci.* **2003**, 254, 235. (c) Trotta, M.; Gallarate, M.; Pattarino, F.; Morel, S., *J. Control. Release* **2001**, 76, 119. (d) Sjostrom, B.; Gergenstahl, *Int. J. Pharm.* **1992**, 88, 53.
- (15) (a) Solans, C.; Izquierdo, P.; Nolla, J.; Azemar, N.; Garcia-Celma, M.J. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2005**, 10, 102. (b) Shchukin, G.; Sukhorukov, G.B.

- Adv. Mater.* **2004**, 16, 8, 671 (c) López-Quintela, M.A.; Tojo, C.; Blanco, M.J.; García-Río, L.; Leis, J.R. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, 9, 264. (d) Mathew, D.S.; Juang, R-S. *Chem. Eng. J.* **2007**, 129, 51. (e) Nakano, M. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2000**, 45, 1.
- (16)(a) Attard, G. S.; Glyde, J. C.; Goltner, C. G. *Nature* **1995**, 378, 366. (b) Attard, G. S.; Bartlett, P.N.; Coleman, N.R.B.; Elliott, J.M.; Owen, J.R.; Wang, J.H. *Science* **1997**, 278, 838. (c) Stupp, S.I.; Braun, P.V. *Science* **1997**, 277, 1242.
- (17) Gradzielski, M. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, 9, 3-4, 256.
- (18)(a) Ohde, H.; Ohde, M.; Bailey, F.; Kim, H.; Wai, C.M. *Nano Lett.* **2002**, 2, 721. (b) Pai, R.A.; Humayun, R.; Schulberg, M.T.; Sengupta, A.; Sun, J.N.; Watkins, J.J. *Science* **2004**, 303, 507.
- (19)(a) Chattopadhyay, P.; Gupta, R.B., *Int. J. Pharm.* **2001**, 228, 19, (b) Reverchon, E.; Della Porta, G., *Powder Technol.* **1999**, 106, 23.
- (20)(a) Perrut, M.; Clavier, J-Y. *Ind. Eng. Chem* **2003**, 42, 6375. (b) Foster, N.; Mammucari, R.; Dehghani, F.; Barret, A.; Bezanehtak, K.; Coen, E.; Cobes, G.; Meure, L.; Ng, A.; Regtop, H. L.; Tandy, A. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2003**, 42, 6476; (c) Ventosa, N.; Veciana, J.; Rovira, C.; Sala, S. *International patent number: WO0216003*, **2000**. (d) Gimeno, M.; Ventosa, V.; Sala, S.; Veciana, J. *Cryst. Growth Des.* **2006**, 6, 23. (e) Cano-Sarabia, M.; Ventosa, N.; Sala, S.; Veciana, J. *Langmuir* **2008**, 24, 2433. (f) Baldyga, J.; Henczka, M.; Shekunov, B.Y., *Supercritical fluid technology for drug product development. Drugs and the pharmaceutical sciences*, Marcel Dekker Series, New York, **2004**, 91.
- (21) Shekunov, B.Y.; Chattopadhyay, P.; Seitzinger, J.; Huff, R., *Pharm. Res.*, **2006**, 23, 1, 196.
- (22)(a) Fernandez, C.A.; Wai, C.M. *Small* **2006**, 2, 1266. (b) H. Ohde, C.M. Wai, H. Kim, J. kim, M. Ohde, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4540.
- (23) Zhang, J.; Han, B.; Zhang, C.; Li, W.; Feng, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47.
- (24)(a) Zhang, J.; Han, B.; Liu, J.; Zhang, X.; He, J.; Liu, Z.; Jiang, T.; Yang, G., *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 17, 3879. (b) Zhang, H.; Liu, J.; Han, B., *J. Supercrit. Fluids* **2001**, 20, 65. (c) Zhang, J.; Han, B.; Liu, J.; Zhang, X.; Zhao, H., *J. Supercrit. Fluids* **2004**, 30, 89.
- (25) Ferro Corp, patente nº US 2004071781-A1.
- (26) Shekunow, B.Y.; Chattopadhyay, P.; Seitzinger, J.; Huff, R., *Pharm. Res.* **2006**, 23, 1, 196.

- (27) Chattopadhyay, P.; Huff, R.; Shekunov, B.Y., *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 3, 667.
- (28) Porta, G.D.; Reverchon, E., *Biotechnol. Bioeng* **2008**, *100*, 5, 1020.
- (29) Chattopadhyay, P.; Gupta, R.B., *Ind. Eng. Chem. Res.* **2003**, *42*, 465.
- (30) Ferro Corporation, patente nº WO 2004110603-A2.
- (31) Fernandez, C.A.; Wai, C.M.; *Small* **2006**, *2*, 11, 1266 .
- (32)  $X_{CO_2} = \text{moles } CO_2 / (\text{moles } CO_2 + \text{moles acetona})$ .
- (33) Pignatello, R.; Bucolo, C.; Spedalieri, G.; Maltese, A.; Puglisi, G. *Biomaterials* **2002**, *23*, 3247.
- (34)(a) Shankland, N.; Wilson, C.C.; Florence, A.J.; Cox, P.J., *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **1997**, *53*, 951. (b) Uchida, H.; Yoshida, M.; Kojima, Y.; Yamazoe, Y.; Matsuoka, M, *J. Chem. Eng. Data* **2005**, *50*, 11.
- (35) Laska, E.M.; Sunshine, A.; Marrero, I.; Olson, N.; Siegel, C.; McCormick, N. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1986**, *40*, 1.
- (36) Rasenack, N.; Müller, B.W. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 12, 1894.
- (37)(a) Pathak, P.; Meziani, M.J.; Desai, T.; Sun, Y-P. *J. Supercrit. Fluids* **2006**, *37*, 279. (b) Kocbek, P.; Baumgartner, S.; Kristl, J. *Int. J. Pharm.* **2006**, *312*, 179.
- (38) Newa, M.; Bhandari, K.H.; Lee, D.X; Sung, J.H.; Kim, J.A.; Yoo, B.K.; Woo, J.S.; Choi, H.G.; Yong, C.S. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2008**, *34*, 1013.
- (39) Ghorab, M.K.; Adeyeye, M.C. *Pharm. Dev. Technol.* **2001**, *6*, 305.
- (40) Adeyeye, C.M.; Price, J.C. *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 575.
- (41) Pathak, P.; Meziani, M.J.; Desai, T.; Sun, Y.-P, *J. Supercrit. Fluids*, **2006**, *37*, 279.
- (42) Rasenack, N.; Müller, B.W., *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1894.
- (43)(a) Wubbots, F. E., *Ph.D. Thesis*, University of Delft (Netherlands) **2000**; (b) Wubbots, F. E.; Bruinsma, O.S.L.; van Rosmalen, G.M., *J. Supercritical Fluids*, **2004**, *32*, 79.
- (44) M. Muntó, *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona, **2005**.
- (45) Muntó, M.; Ventosa, N.; Sala, S.; Veciana, J. *J. Supercrit. Fluids* **2008**, *47*, 147.
- (46)(a) Ventosa, N.; Sala, S.; Torres, J; Llibre, J.; Veciana, J. *Cryst. Growth Des.* **2001**, *1*, 299; (b) Ventosa, N.; Sala, S.; Veciana, J., *J. Supercrit. Fluids* **2003**, *26*, 33; (c) Ventosa, N.; Veciana, J.; Rovira, C.; Sala, S., (Carbueros Metálicos S.E), Patente WO0216003, ES2170008, EP1314465, US2003098517, CA2426449, AU8406501 **2000**; (d) Sala, S., Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona **2005**; (e) Muntó, M. *Trabajo de Investigación*, Universidad Autónoma de Barcelona **2005**.

- (47)(a) Charoenchaitrakool, M.; Deghani, F.; Foster, N. R., *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, *39*, 4794. (b) Hermsdorf, D.; Jauer, S.; Signorell, R., *Mol. Phys.* **2007**, *105*, 8, 951.
- (48) Ventosa, N.; Veciana, J.; Sala, S.; Cano, M.; "Procedimiento para la obtención de micro- o nanopartículas sólidas", **2008**, Patent priority number: P200803753
- (49) Horn, J.R., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4330.
- (50)(a) N. Ventosa, S. Sala, J. Torres, J. Llibre, J. Veciana, *Cryst. Growth Des.* **2001**, *1*, 299; (b) N. Ventosa, S. Sala, J. Veciana, *J. Supercrit. Fluids* **2003**, *26*, 33; (c) N. Ventosa, J. Veciana, C. Rovira, S. Sala (Carburos Metálicos S.E), Patente WO0216003, ES2170008, EP1314465, US2003098517, CA2426449, AU8406501 **2000**; (d) S. Sala, *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona **2005**; (e) M. Muntó, *Trabajo de Investigación*, Universidad Autónoma de Barcelona **2005**.
- (51)(a) Prieto, S.A., Méndez, J.B., Otero, F.J., *Tecnología farmacéutica*, VI Congreso SEFIG, 201-204. (b) Baert, L., Vermeersch, H.; Remon, J.P.; Smeyers-Verbeke, J., Massort, D.L., *Int. J. Pharm.* **1993**, *96*, 225.
- (52)(a) M.A.López-Quintela, C.Tojo, M.C.Blanco, L.Garcia-Rio, J.R. Leis, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, *9*, 264. (b) C.A. Fernandez, C.M. Wai; *Small* **2006**, *11*, 1266. (c) J.S. Wang; C.M.Wai; *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *40*, 176. (d) H.M.Woods, M.M.G.C.Silva, C.Nouvel, K.M.Shakeshef, S.M.Howle, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 1663.
- (53) Reverchon, E.; Adami, R., *J. Supercrit. Fluids* **2006**, *37*, 1.
- (54) Pawar, A., Paradkar, A., Kadam, S, Mahadik, K, *AAPS PharmSciTech* **2004**, *5*, 4.
- (55) Shankland, N., Cox, P.J., *Chem. Commum.* **1996**, *182*, 855.
- (56)(a) Wulff, M., Alden, M., Tegenfeldt, *J. Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 240. (b) Naime, Z., Siro, T., Gines-Dorado, J-M., Chantal, C., Rene, C., Jerome, D., *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *12*, 395.
- (57) Newa, M, Bhandari, K.H., Lee, D.X., Sung, J.H., Kim, J.A., Yoo, B.K., Woo, J.S., Choi, H.G., Yong, C.S., *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2008**, *34*, 1013.



# Capítulo 6

## Parte Experimental

### 6.1 Materiales

El colesterol (5-cholesten-3 $\beta$ -ol, pureza 95%) ha sido suministrado por Panreac (Barcelona, España). El solvent blue 35 (1,4-bis-(n-butilamino)-9,10-antraquinone, pureza 98%), el CTAB (cetil trimethylammonium bromide, pureza 99%), el Tween 80 (polyoxyethylenesorbitan monooleate), el AOT (bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate sodium salt, pureza 99%), la fosfatidilcolina (FC from egg yolk), el PIN (pinacyanol chloride), y el polietilenglicol 6000 (PEG6000) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El ibuprofeno (ácido ( $\pm$ )-2-(4-isobutilfenil propiónico, pureza 99,5%) fue suministrado por Fagron Iberica (Barcelona, España).

La acetona (pureza 99,5%) y el etanol (pureza 99,6%) han sido suministrados por Romyl (Teknokroma, Barcelona, España). El dióxido de carbono (pureza 99,9%) fue suministrado por Carburos Metálicos S.A. (Barcelona, España). Todos los productos químicos fueron utilizados sin ninguna purificación adicional. El agua fue desionizada y purificada mediante un equipo Elix Water Purification System Millipore (con una conductividad inferior a 0,2 $\mu$ S cm<sup>-1</sup>).

### 6.2 Técnicas e instrumentación utilizadas para la caracterización de los materiales moleculares obtenidos

#### 6.2.1 Técnicas de dispersión de luz

- *Dispersión de luz estática (laser diffraction, LS)*. Las distribuciones volumétricas de tamaño de partícula de los sistemas dispersos obtenidos fueron medidas mediante la técnica de dispersión de luz estática con el analizador de partículas Beckman-Coulter (USA), modelo LS13320, con tecnología PIDS. Esta técnica es adecuada para medir partículas cuyo rango de tamaños esté comprendido entre 0,4-2.000  $\mu$ m. Para llevar a cabo la medida del tamaño de

partícula con esta técnica, previamente se sometió la muestra a un baño de ultrasonidos durante quince minutos, para asegurar la disgregación de las partículas.

- **Dispersión de luz dinámica (dynamic Light scattering, DLS).** Las dispersiones con tamaños de partícula comprendidos entre 0,6-6  $\mu\text{m}$  se analizaron mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) combinada con tecnología la NIBS, mediante el equipo Malvern Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, UK). La caracterización de las dispersiones por esta técnica se realizó en todos los casos justo después de la preparación de mismas, sin dilución alguna ni aplicación de ultrasonidos. El volumen de muestra analizada fue de 1.1mL.

El tamaño de partícula de las nanodispersiones se expresó a través del diámetro medio en volumen de la distribución,  $D(0,5)$  y el índice de uniformidad,  $I.U.$  definido como:

$$I.U. = \frac{D(0,1)}{D(0,9)} \cdot 100 \quad (1)$$

donde  $D(0,1)$  es el diámetro (nm) por debajo del cual queda el 10% de la distribución de partículas en volumen y  $D(0,9)$  es el diámetro (nm) por debajo del cual queda el 90%.

### 6.2.2 Potencial zeta ( $\zeta$ )

Mediante la medida del potencial zeta se determinó la carga superficial de las partículas dispersas en la fase acuosa y la magnitud de las interacciones electroestáticas entre las partículas que forman el sistema disperso. Las medidas de potencial zeta se realizaron con el equipo Malvern Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, UK). Las medidas de potencial zeta de las dispersiones se realizaron inmediatamente después de la preparación de mismas sin dilución ni aplicación de ultrasonidos. El volumen de muestra analizada fue de 2mL.

### 6.2.3 Turbidimetría.

La estabilidad los sistemas dispersos se caracterizaron mediante la medida de la variación de su turbidez a lo largo del tiempo. Estas medidas se realizaron utilizando un analizador óptico Turbiscan Lab Expert (Formulation, Francia), basado en tecnologías de múltiple dispersión de luz. Los sistemas dispersos se analizaron inmediatamente

después de ser preparados y sin dilución. Concretamente se estudio la variación con el tiempo (t) del % de luz dispersada por la muestra a distintas alturas (h) del vial que lo contiene. Las medidas se realizaron durante 8 horas con una frecuencia de escaneó de 30 minutos.

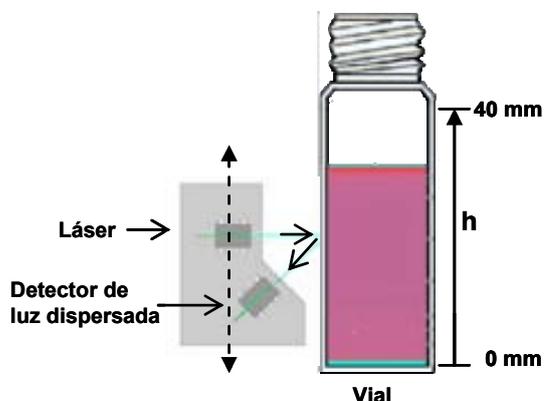


Figura 6.1. Principio de medida del turbidímetro.

#### 6.2.4 Microscopias

- **Microscopia electrónica de transmisión criogénica (cryo-TEM).** Las características estructurales y la organización de fases de las dispersiones fueron determinadas mediante microscopia electrónica de transmisión en condiciones criogénicas (Jeol JEM-1400 microscope, Jeol, Alemania). La preparación de las muestras congeladas se llevó a cabo en un sistema de vitrificación con ambiente controlado (CEVS), Leica modelo EM-CPC (Leica Microsystems, Alemania). Una rejilla estándar de TEM de cobre cubierta con una película fina de carbono agujereada se fijó en el CEVS mediante unas pinzas de sujeción. 2 $\mu$ l de la muestra se añadieron a dicha rejilla, después de 30 segundos, la muestra se “bloteó” gentilmente con un papel de filtro de doble capa para obtener una película fina de 20-400nm de la misma, para después inmediatamente sumergirla por caída libre en un baño de etano a -180 °C, provocando la vitrificación de la muestra con una velocidad de enfriamiento extremadamente rápida (100K/s), evitando la formación de artefactos, y por tanto, la alteración de la microestructura original.

Después de la preparación de las muestras, éstas se almacenaron en un recipiente con nitrógeno líquido (-196°C) y seguidamente se transfirieron al goniómetro del microscopio electrónico usando un cryo-transfer Gatan modelo 626 CTH, (Gatan, USA). Las condiciones de trabajo fueron a vacío, a una temperatura por

debajo de  $-175\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a un voltaje de 120 kV. Las imágenes de las nanopartículas sobre vidrio amorfo en los agujeros de carbono fueron grabadas digitalmente con una cámara digital Gatan 724 multiscan CCD y procesadas con el programa DigitalMicrographs versión 3.9.2.

Las imágenes de cryo-TEM han sido registradas por la Sra. Cristina Patiño y Sra. Rocío Arranz del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC, Madrid, España) y en el Servei de Microscopia de la Universidad Autònoma de Barcelona (UAB) bajo la supervisi3n de la Dr. Emma Rossinyol.

- **Microscopia 3ptica por luz transmitida y polarizada.** Los materiales moleculares nanoparticulados han sido tambi3n examinados usando un microscopio 3ptico (Olympus BX51TRF, Olympus, Tokyo, Japan) por luz transmitida y polarizada. Im3genes de los diferentes materiales fueron grabadas usando una c3mara digital CCD Olympus.
- **Microscopia electr3nica de barrido (SEM)**

Las medidas de SEM se han llevado a cabo en un microscopio HITACHI S-570 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) con voltajes comprendidos entre 5-20 kV. En todos los casos, las muestras fueron preparadas mediante la deposici3n de una gota de una suspensi3n de las part3culas obtenidas, sobre una cinta de carbono adhesiva de doble cara, seguido de la evaporaci3n del disolvente a condiciones ambientales. Finalmente, las muestras fueron metalizadas con una fina capa de oro (sputter coater K550, Emitech, Ashford, UK).

En el caso de las part3culas de ibuprofeno, la suspensi3n fue preparada sobre agua previamente saturada con ibuprofeno y con un 0,1% (v/v) del tensoactivo Nonidet 40 (4-Nonylphenyl-polyethylene glycol). Los tamaños de las part3culas de ibuprofeno fueron obtenidos directamente de las im3genes de SEM, mediante la medida de la imagen de cada part3cula. La medida del tamaño de 200 part3culas fue usada en el an3lisis estad3stico para determinar el di3metro medio de part3cula y la distribuci3n de tamaños correspondiente.

### 6.2.5 Calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry, DSC).

Las medidas de DSC se llevaron a cabo en un calorímetro (DSC7, Perkin Elmer, USA) acoplado a un analizador térmico. 2mg de la muestra fue depositada en un portamuestra de aluminio sellado, y calentada a una velocidad de barrido de 5°C/min bajo un flujo de nitrógeno de 25mL/min.

### 6.2.6 Rayos X

- **Difracción de Rayos X en polvo** (Power X-ray diffraction (XRD)). Las partículas sintetizadas fueron caracterizadas por difracción de rayos X en polvo con un difractómetro (D5000, Siemens, Germany), usando un fuente de radiación incidente de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ ). Los difractogramas fueron realizados entre valores de  $2\theta$  comprendidos entre 5° y 55°, con una velocidad angular de  $1^\circ\text{min}^{-1}$  y un “step size” de 0,02°.
- **Difracción de Rayos X en capilar a ángulo grande y pequeño (small and wide angle X-ray scattering –SWAXS)**. En todas las medidas, 1 gota de muestra se colocó en un capilar y se centrifugó durante 5 minutos a 5000 r.p.m. El capilar se analizó en un difractómetro S3 MICRO (Hecus X-ray Systems, Austria) equipado con una fuente de rayos X GENIX (Xenocs, Grenoble). Las medidas se llevaron a cabo a 50KV y 1mA. La longitud de onda utilizada fue de 0,1542 nm. De cada muestra se hicieron tres medidas de 1 hora cada una. Los resultados obtenidos fueron analizados con el software 3D View V4.1.

Para llevar a cabo la determinación de la composición de fases del sistema CTAB/colesterol por SWAXS, 10g de la correspondiente muestra CTAB/colesterol fue centrifugada durante 1 hora a 20.000 r.p.m. Después se tomo una alícuota de cada una de las fases observadas en el tubo de centrifugación y se analizaron.

Estas medidas han sido realizadas en el departament de Química Col·loïdal i Interfacial del Institut d’Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona (IIQAB-CSIC) bajo la dirección de Dr. Jordi Esquena y Prof. Conxita Solans.

### 6.2.7 Espectroscopias

- **Espectroscopia de infrarrojo (Fourier Transform Infrared Spectroscopy).** Los espectros de los materiales moleculares obtenidos se han registrado en un espectrofotómetro de transformada de Fourier a alta resolución (FT-IR) Spectrum One, Perkin Elmer, USA) con el modo de reflexión total atenuada (attenuated total reflection mode, ATR), y una resolución de  $2\text{ cm}^{-1}$ .
- **Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-Vis).** Los espectros fueron registrados en un espectrofotómetro Cary 5E Varian en el ICMAB-CSIC, y durante la estancia en Paris en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 UV/Vis (Perkin-Elmer, USA).

## 6.3 Medidas de solubilidad en disolventes convencionales

Para la determinación de la solubilidad de un soluto en un disolvente orgánico convencional se procedió de la siguiente manera. Se prepararon disoluciones saturadas del soluto en un disolvente orgánico (el soluto está en equilibrio con la disolución saturada). Después se agitó la disolución saturada durante una hora a la temperatura deseada mediante un baño de agua con temperatura controlada. Para temperaturas alrededor de los 273K se utilizó un baño de agua y hielo, y para temperaturas más bajas se utilizaron baños criogénicos con nieve carbónica ( $\text{CO}_2$ ). Seguidamente, se paró la agitación, y se mantuvo la mezcla saturada a la misma temperatura durante media hora. Se extrajo un volumen conocido de la disolución con una pipeta, se filtró, y se pesó en una balanza de precisión ( $\pm 0,0001\text{g}$ ), obteniéndose  $n^\circ\text{soluto} + n^\circ\text{org}$ . El siguiente paso fue evaporar la alícuota tomada hasta sequedad para conocer la cantidad de sólido disuelto,  $n^\circ\text{soluto}$ . Dicho sólido se secó totalmente en una bomba de vacío durante dos horas, para después pesarlo también en una balanza de precisión. Este procedimiento se realizó dos veces. Las solubilidades se expresaron en términos de moles de soluto/moles de disolvente, ( $n^\circ\text{soluto}/n^\circ\text{org}$ ). La utilización de este procedimiento de medida conlleva un error sistemático inferior al 0,1%.

## 6.4 Determinación de solubilidades en disolventes orgánicos expandidos con CO<sub>2</sub> (método del punto evanescente)

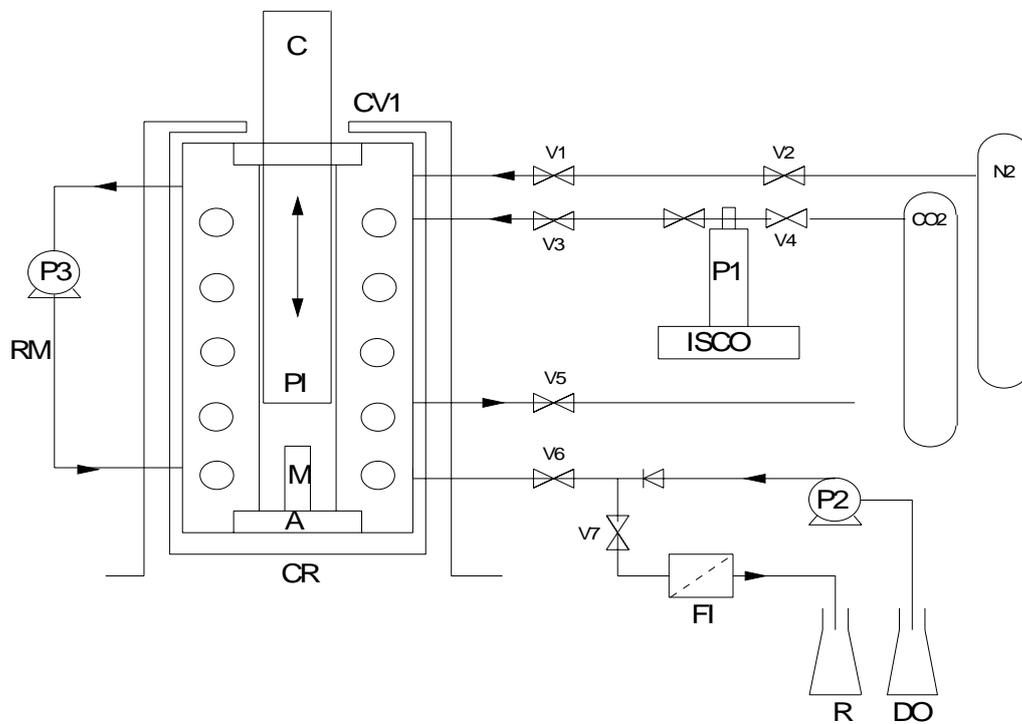
La determinación de las solubilidades por el método del punto evanescente (Vanishing point)<sup>(1)</sup> se llevaron a cabo en un analizador de fases a alta presión basado en una celda de volumen variable, diseñado y construido mediante una estrecha colaboración entre el departamento de Nanociencia Molecular y Materiales Orgánicos (NMMO) del ICMAB y el departamento de investigación de Carburos Metálicos. El diagrama de flujo del analizador de fases mencionado está representado en la Figura 6.2.

El analizador de fases está formado por un reactor de alta presión *CVI*, de volumen variable y de acero inoxidable con dos mirillas laterales de zafiro (Jerguson modelo 16-T-40). El elemento que permite la variación del volumen interno de la celda es un pistón *PI* de acero inoxidable 316 que se introduce dentro del reactor hasta una profundidad máxima de 20 cm. La celda de volumen variable está situada en el interior de una cámara de temperatura *CR* (Binder MK 53) con temperaturas mínima y máxima de trabajo de -35°C y 180°C respectivamente. El fluido interno de la celda se homogeneiza mediante una bomba *P3* externa de recirculación *RM* (Micropump serie 180). Consta de un transductor de presión (Keller serie 8) y una sonda de temperatura (pt-100). La celda está mecanizada por la parte inferior para adaptarle un tapón porta-sustancias *M*, para introducir sustancias sólidas en su interior. El volumen mínimo del reactor es de 50mL cuando el pistón se encuentra a la máxima profundidad, mientras que cuando este se encuentre en su máximo recorrido, el volumen del reactor será de 75mL.

El movimiento del pistón está gobernado por un cilindro neumático *C* (SMC CE2B63-200J) con una línea de aire comprimido. El pistón está preparado para trabajar con una presión mínima y máxima de 0,1MPa y 1MPa respectivamente. La presión máxima que puede alcanzar el sistema es de 3MPa.

El CO<sub>2</sub> se introduce en la celda por medio de una bomba de jeringa *PI* (ISCO 260D) a través de la apertura de la válvula *V3*. El N<sub>2</sub> llega directamente desde una bombona a una presión determinada regulada por un manorreductor. El N<sub>2</sub> se introduce en la celda a través de la apertura de la válvula *VI*. La alimentación de disolventes o disoluciones orgánicas hacia el interior del reactor se realiza a través de la válvula *V6*, para ello se

utiliza una bomba tipo HPLC de alta presión  $P2$  (JASCO PU-1580). La apertura de las válvulas  $V6$  y  $V7$  permite la evacuación de los fluidos presentes en el interior de la celda.

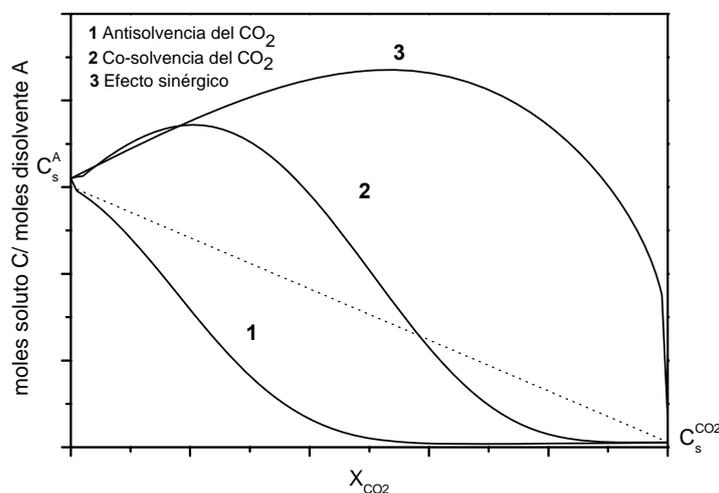


**Figura 6.2.** Diagrama de flujo del analizador de fases. A: sistema de agitación; C: cilindro neumático; CV1: celda de volumen variable; CR: cámara de calor o frío; DO: disolvente o disolución orgánica; FI: filtro; P: bomba; PI: pistón; R: residuo; RM: sistema de recirculación; V: válvula. M: muestra sólida.

El método del punto de evanescente de determinación de solubilidades en fluidos comprimidos se encuentra descrito en los trabajos de F.E. Wubbots y col.<sup>(1)</sup> Este método se basa en la observación progresiva, y finalmente completa, de la redisolución de un sólido  $C$  que se encuentra en equilibrio con una fase saturada de él mismo en dos fluidos  $A$  y  $B$  miscibles entre sí, la cual se da como consecuencia del cambio de composición de la fase binaria  $A/B$ , para aumentar su poder disolvente. Este método es adecuado para determinar solubilidades tanto a presión atmosférica, donde los dos disolventes  $A$  y  $B$  son disolventes orgánicos convencionales, como a alta presión, donde  $A$  y  $B$  son respectivamente, un disolvente orgánico convencional y un fluido comprimido, como por ejemplo el  $\text{CO}_2$ .

La celda de volumen variable descrita anteriormente nos permite medir diferentes curvas de solubilidad de sistemas “soluto/disolvente orgánico  $A/B$ ”, tales

como la que se muestran en la Figura 6.3, donde el fluido B puede tener diferentes comportamientos respecto a la disolución de C en A. Así, puede actuar como antisolvente (curva 1), cosolvente (curva 2), o puede producir efectos sinérgicos en la capacidad solvatadora de la mezcla binaria A/B de disolventes (curva 3).<sup>(2)</sup>



**Figura 6.3.** Diferentes tipos de curvas de solubilidad en sistemas “soluto/disolvente orgánico/CO<sub>2</sub>”: (a) La curva 1 representa un comportamiento de solubilidad con antisolventia del CO<sub>2</sub> (b) La curva 2 representa un comportamiento de solubilidad con cosolventia del CO<sub>2</sub> (c) La curva 3 representa un comportamiento sinérgico. Las líneas a trazos representan, para cada sistema, la variación ideal lineal de la solubilidad con la composición del disolvente.

En la curva **1**, la adicción del CO<sub>2</sub> sobre una disolución saturada del compuesto C en el disolvente orgánico A provoca la precipitación del compuesto C, por tanto, el CO<sub>2</sub> se comporta como antisolvente. En la curva **2**, existe un rango de  $X_{CO_2}$  para el cual el fluido comprimido actúa como cosolvente, por tanto, sin provocar la precipitación del compuesto C. Este rango viene determinado por el punto de intersección entre la recta correspondiente a la variación ideal lineal de la solubilidad con la curva real de variación de la solubilidad del compuesto C con la composición de la mezcla binaria “disolvente orgánico/CO<sub>2</sub>”. Las curvas **1** y **2** tienen en común que la adicción del CO<sub>2</sub> sobre una disolución de C en el disolvente A provoca una disminución de la solubilidad de C. En el caso de la curva **3**, la adicción de CO<sub>2</sub> genera un sistema binario de capacidad solvatadora superior al disolvente orgánico A, provocando por tanto, un efecto sinérgico del CO<sub>2</sub> y del disolvente orgánico sobre la solubilidad del compuesto C en un rango determinado de  $X_{CO_2}$ .

La metodología empleada en este trabajo para la determinación de solubilidades de solutos en disoluciones expandidas con  $\text{CO}_2$ , utilizando el analizador de fases anteriormente descrito, se puede resumir en las siguientes etapas:

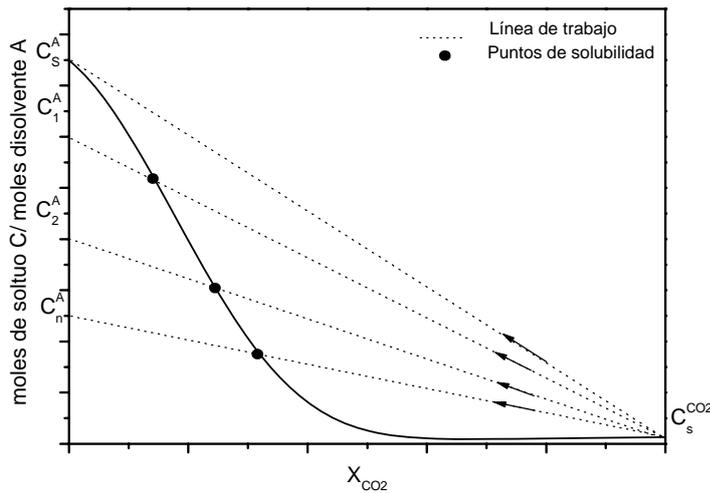
1. Preparación en el interior de la celda de volumen variable, una disolución “soluto/disolvente orgánico/ $\text{CO}_2$ ” sobresaturada a las condiciones de presión  $P_w$  y de temperatura  $T_w$  de trabajo deseadas.
2. Adición de los componentes adecuados (disolvente orgánico, fluido comprimido, disolución) sobre esta disolución inicial según una línea de trabajo previamente determinada, para facilitar la progresiva disolución del soluto en estado sólido, hasta observarse su completa desaparición. Este momento corresponde al punto de corte entre la línea de trabajo y la curva de solubilidad, y por tanto, determina el valor de la solubilidad.

Una línea de trabajo representa la variación de la composición del sistema en moles de soluto / moles de disolvente a medida de que se va introduciendo disolvente en la celda, es decir, cada uno de sus puntos representará la concentración de  $C$  en una mezcla binaria  $A$  y  $B$  distinta.

En función del tipo de línea de trabajo empleada para determinar los puntos de evanescencia tendremos diferentes procedimientos de medida.<sup>2</sup>

Procedimiento de medida 1 para curvas con efecto anti-solvente del  $\text{CO}_2$  a partir de líneas de trabajo  $X_{\text{CO}_2}=1 \rightarrow X_{\text{CO}_2}=0$

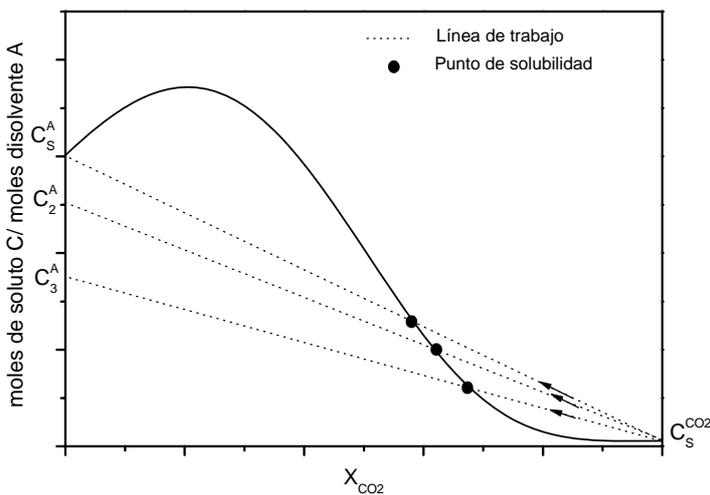
En este procedimiento, las líneas de trabajo utilizadas evolucionan desde  $X_{\text{CO}_2}=1 \rightarrow X_{\text{CO}_2}=0$ . Este método está basado en la adición de una disolución de soluto en el disolvente convencional  $A$ , sobre un determinado volumen de  $\text{CO}_2$  contenido en la celda  $X_{\text{CO}_2}=1$ , hasta alcanzar el punto evanescente a  $P_w$  y  $T_w$ , siguiendo la línea de trabajo, definida por la concentración de esta disolución,  $C^A$ . Tal y como se puede observar en la Figura 6.4, en función de cual sea la concentración del soluto en el disolvente orgánico ( $C^A_1, C^A_2, \dots, C^A_n$ ) se podrá conseguir la medida de diferentes puntos de la curva de solubilidad.



**Figura 6.4.** Ejemplos de puntos de solubilidad medidos mediante el procedimiento 1.

Procedimiento de medida 2 para curvas con efecto cosolvente del  $\text{CO}_2$  o efecto sinérgico a partir de líneas de trabajo  $X_{\text{CO}_2}=1 \rightarrow X_{\text{CO}_2}=0$

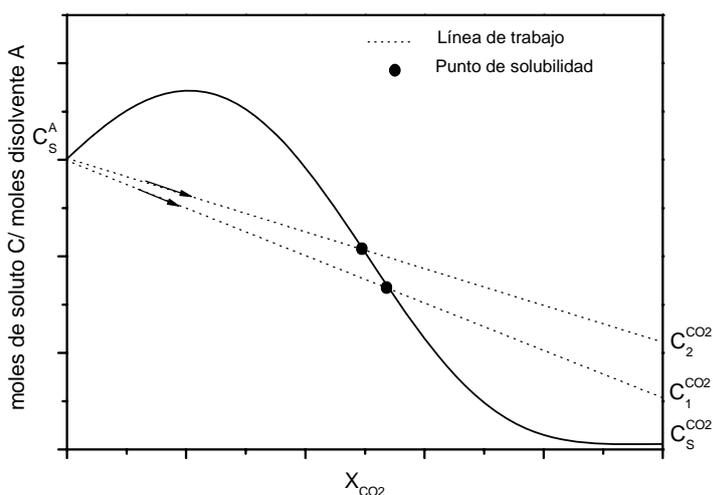
Con este procedimiento se pueden determinar valores de solubilidad complementarios a las que se obtienen con el procedimiento 1. Cuando la curva de solubilidad del sistema se caracteriza por tener un comportamiento del  $\text{CO}_2$  cosolvente en un rango determinado de concentraciones de la fase disolvente, el procedimiento 1, solo nos permite medir un número limitado de puntos de solubilidad en zonas próximas a  $X_{\text{CO}_2}=1$ . En la Figura 6.5 se describe gráficamente esta limitación.



**Figura 6.5.** Puntos de solubilidad obtenidos mediante el procedimiento 1 para una curva con efecto de cosolventancia del  $\text{CO}_2$ .

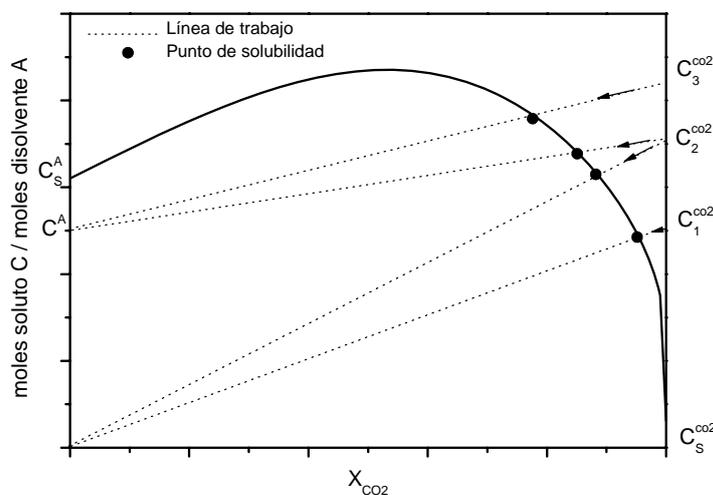
Para poder medir puntos de solubilidad a fracciones molares de  $\text{CO}_2$  inferiores, es necesario cargar la celda con soluto además de  $\text{CO}_2$ . La carga de sólidos en la celda se realiza a través de un portamuestras situado sobre el tapón de cierre inferior de la misma. Una vez introducido el portamuestras, la celda se presuriza con  $\text{CO}_2$  a  $P_w$  y  $T_w$ .

Después se bombea disolución de soluto en disolvente orgánico a una concentración determinada, sobre la mezcla “sólido/CO<sub>2</sub>”. Durante la adición se produce una progresiva disolución del sólido debido al enriquecimiento de la mezcla en disolvente orgánico. Las líneas de trabajo dependerán de la cantidad de soluto introducido en el portamuestras y la concentración del soluto en la disolución que se adiciona. Tal y como se observa en la Figura 6.6, con la combinación de estos dos procedimientos la curva de solubilidad queda completamente descrita en todo el rango de composiciones de la mezcla disolvente.



**Figura 6.6.** Puntos de solubilidad obtenidos mediante el procedimiento 2 para una curva con efecto de co-solvencia del CO<sub>2</sub>.

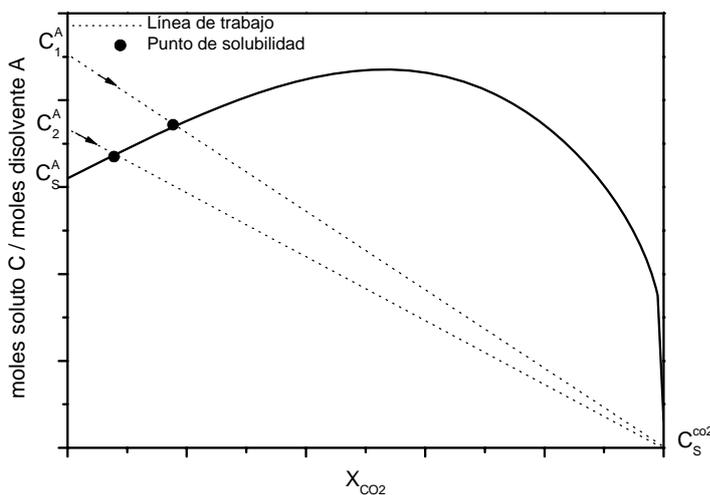
El procedimiento de carga adicional de soluto sólido en la celda antes de la presurización es prácticamente necesario en el caso de la determinación de curvas de solubilidad de sistemas que presenten efecto sinérgico. Por otro lado, también existe la posibilidad de realizar un bombeo de disolvente puro A sobre la mezcla inicial de “soluto/CO<sub>2</sub>”  $X_{CO_2}=1$ , obteniéndose los puntos de solubilidad descritos en la Figura 6.7.



**Figura 6.7.** Puntos de solubilidad obtenidos mediante el procedimiento 2 para una curva con efecto sinérgico mediante la adición de disolvente puro A sobre la mezcla “sólido/CO<sub>2</sub>”.

Procedimiento de medida 3 para curvas con efecto sinérgico a partir de líneas de trabajo  $X_{CO_2}=0 \rightarrow X_{CO_2}=1$

En este procedimiento las líneas de trabajo utilizadas evolucionan desde  $X_{CO_2}=0 \rightarrow X_{CO_2}=1$  en la determinación del punto de corte con la curva de solubilidad. Con este procedimiento se pueden determinar puntos de solubilidad en las zonas próximas a  $X_{CO_2}=0$ . El procedimiento de operación está basado en la preparación de una disolución supersaturada del soluto  $C$  en el disolvente  $A$  ( $X_{CO_2}=0$ ), sobre la que se adiciona  $CO_2$  a  $P_w$  y  $T_w$ , siguiendo el tipo de líneas de trabajo representadas en la Figura 6.8, hasta conseguir la completa disolución del sólido. En este caso también se requiere el uso del portamuestras para introducir más sólido del que es capaz de disolver el disolvente orgánico  $A$  ( $C^A > C^A_s$ )



**Figura 6.8.** Puntos de solubilidad obtenidos mediante el procedimiento 3 para una curva con efecto sinérgico mediante la adición de  $CO_2$  sobre una disolución saturada del soluto  $C$  en el disolvente orgánico  $A$ .

**Protocolo operacional del método “Vanishing point”**

Para llevar a cabo los tres procedimientos de medida descritos anteriormente, se deben realizar las siguientes operaciones descritas a continuación. El orden de realización de las mismas dependerá del sentido de la línea de trabajo ( $X_{CO_2}=1 \rightarrow X_{CO_2}=0$  o  $X_{CO_2}=0 \rightarrow X_{CO_2}=1$ )

Operación 1

En esta operación se coloca el pistón de la celda en su posición más baja. En el caso que sea necesario, se introduce, por la parte inferior de la celda, el portamuestras

con la cantidad de sólido deseada. Se hace vacío dentro de la celda, y se fija la temperatura de trabajo en la cámara de frío/calor.

### Operación 2

Si se trabaja en el sentido de  $X_{CO_2}=1 \rightarrow X_{CO_2}=0$ , se bombeará dentro de la celda una determinada cantidad de  $CO_2$  mediante la bomba ISCO (P1). A continuación, se introducirá mediante la bomba JASCO (P2), la cantidad de disolución del soluto  $C$  en el disolvente  $A$  o de disolvente orgánico puro necesaria hasta llegar a la  $P_w$ . El siguiente paso será activar la recirculación para conseguir, lo más rápidamente posible, el equilibrio termodinámico. Si se trabajará en sentido contrario,  $X_{CO_2}=0 \rightarrow X_{CO_2}=1$ , se deben realizar las operaciones anteriores de forma inversa.

### Operación 3

En este punto estamos situados en la zona inicial de la línea de trabajo, definido por las cantidades iniciales de soluto y disolventes introducidos en la celda. A partir de este momento, se estudiará la evolución a lo largo de la línea de trabajo hasta cruzar con la curva de solubilidad en el punto de solubilidad. En el sentido  $X_{CO_2}=1 \rightarrow X_{CO_2}=0$ , esta evolución se realiza mediante la adición de disolución del soluto en el disolvente convencional o de disolvente orgánico puro sobre la mezcla. Por otro lado, cuando se trabaja en el sentido  $X_{CO_2}=0 \rightarrow X_{CO_2}=1$ , la evolución a lo largo de la línea de trabajo se consigue mediante la adición de  $CO_2$  sobre la mezcla “sólido/disolución saturada”. En ambos casos, las adiciones deben realizarse de forma lenta y progresivamente hasta observar que el sólido ha desaparecido completamente.

### Operación 4

Una vez alcanzada una sola fase homogénea se realizará el balance másico oportuno de todos los componentes introducidos en la celda de volumen variable. A partir de este balance podemos determinar la fracción molar de  $CO_2$  y el valor de solubilidad de solutos en la mezcla binaria  $A/B$ .

La utilización de este procedimiento de medida en nuestro analizador de fases conlleva un error sistemático inferior al 1% en la determinación de solubilidades, e inferior al 2% en la determinación de valores de fracción molar de  $CO_2$ .

## 6.5 Datos de solubilidad descritos en la memoria

En la Tabla 6.1 se enumeran los datos de solubilidad,  $C_s$ , que se han determinado en el presente trabajo y que ha sido utilizados para describir la curva de solubilidad del colesterol en mezclas acetona/ $\text{CO}_2$ . Esta curva de solubilidad ha sido obtenida mediante el ajuste de los datos de solubilidad a la Ecuación 2.<sup>(1)</sup>

$$C_s = C_s^A \cdot (1 - X_B)^{(\alpha + \beta X_B)} + C_s^B X_B \quad (2)$$

**Tabla 6.1.** Medidas de solubilidad descritas en este trabajo.

| Método utilizado  | $X_{\text{CO}_2}$ | $C_s$ (moles soluto/moles disolvente) |
|---|-------------------|---------------------------------------|
| Sistema "colesterol/acetona/ $\text{CO}_2$ " a $P_w=10\text{MPa}$ y $T_w=308\text{K}$ |                   |                                       |
| Disolventes convencionales  | 0                 | 6,42E-03                              |
| "Vanishing point"   | 0,082             | 5,75E-03                              |
| "Vanishing point"   | 0,222             | 4,52E-03                              |
| "Vanishing point"   | 0,352             | 3,84E-03                              |
| "Vanishing point"   | 0,458             | 3,27E-03                              |
| "Vanishing point"   | 0,569             | 2,41E-03                              |
| "Vanishing point"   | 0,657             | 1,72E-03                              |
| "Vanishing point"   | 0,704             | 1,08E-03                              |
| "Vanishing point"   | 0,798             | 6,26E-04                              |
| "Vanishing point"   | 0,9               | 2,12E-04                              |
| "Vanishing point"   | 1                 | 5,00E-05                              |

## 6.6 Densidad óptica

La densidad óptica (O.D.) se define como la absorbancia (A) que presenta un determinado elemento óptico a una longitud de onda ( $\lambda$ ) por unidad de camino óptico del elemento (l).

$$OD_\lambda = \frac{A_\lambda}{l} \quad (1)$$

La longitud de onda ( $\lambda$ ) seleccionada para llevar a cabo las medidas de densidad óptica, debe ser una en la cual el sistema no absorba. Una medida de densidad óptica no

deja de ser una medida de la turbidez del sistema, es decir, es una medida de la luz difractada por la muestra. A través de medidas de densidad óptica, es posible detectar cambios de fases en sistemas líquidos a nivel micro- y nanoscópico.<sup>(3)</sup> Los valores de densidad óptica de una determinada muestra están estrechamente ligados a la concentración y tamaño de las fases que la constituyen. Así, una disolución de un compuesto correspondiente a una única fase líquida homogénea, tendrá un valor de densidad óptica igual a 0, mientras que un sistema heterogéneo que no sea ópticamente transparente, como por ejemplo una emulsión, un sistema vesicular, ó una suspensión de partículas presentará valores de densidad óptica distintos a cero. Ahora bien, los sistemas formados por una sola fase ópticamente transparente, estables termodinámicamente, pero con una cierta estructuración a nivel nanoscópico, como las micelas o las microemulsiones, tienen valores de densidad óptica distintos de cero, e inferiores a los que presentan los sistemas heterogéneos de varias fases. Por ejemplo, la densidad óptica ha sido utilizada para estudiar mecanismos de transición entre vesículas y micelas mediante la dilución del sistema, y para estudiar el comportamiento de fases de mezclas de tensoactivos susceptibles de formar vesículas (liposomas) bajo ciertas condiciones.<sup>(4)</sup>

En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado la densidad óptica para estudiar la transición de fases entre diferentes sistemas dispersos CTAB/colesterol conteniendo diferentes concentraciones de colesterol y CTAB (Capítulo 3), y para detectar cambios estructurales en sistemas “disolvente orgánico/agua/CO<sub>2</sub>” y “soluto/disolvente orgánico/agua/CO<sub>2</sub>” a nivel micro- y nanoscópico, como por ejemplo, la formación y destrucción de microemulsiones a alta presión (Capítulos 4 y 5).

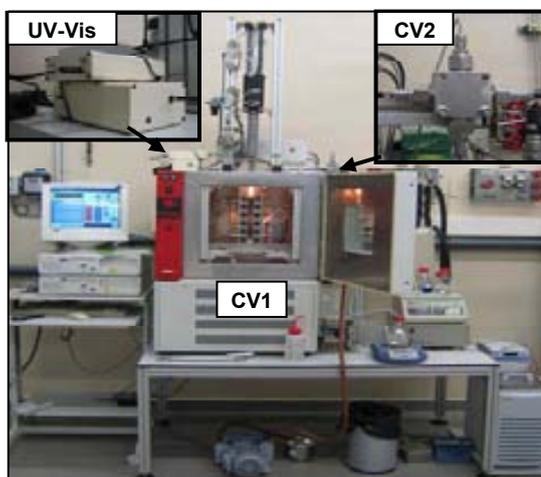
### **6.6.1 Densidad óptica en sistemas CTAB/colesterol**

En el Capítulo 3 de la presente Tesis Doctoral, la densidad óptica ha sido utilizada para determinar los cambios en la organización supramolecular observados en la mezcla CTAB/colesterol cuando se varía la relación molar CTAB/colesterol ( $Q$ ). La variación de densidad óptica en el sistema inducida por sucesivos cambios de concentración de colesterol en el mismo, se estudió mediante el análisis de sus espectros de absorción de ultravioleta-visible registrados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 UV/Vis (Perkin-Elmer, USA), usando una pareja de cubetas con 1cm de camino óptico y tasmostatizadas a 25°C. En este estudio, la longitud de onda

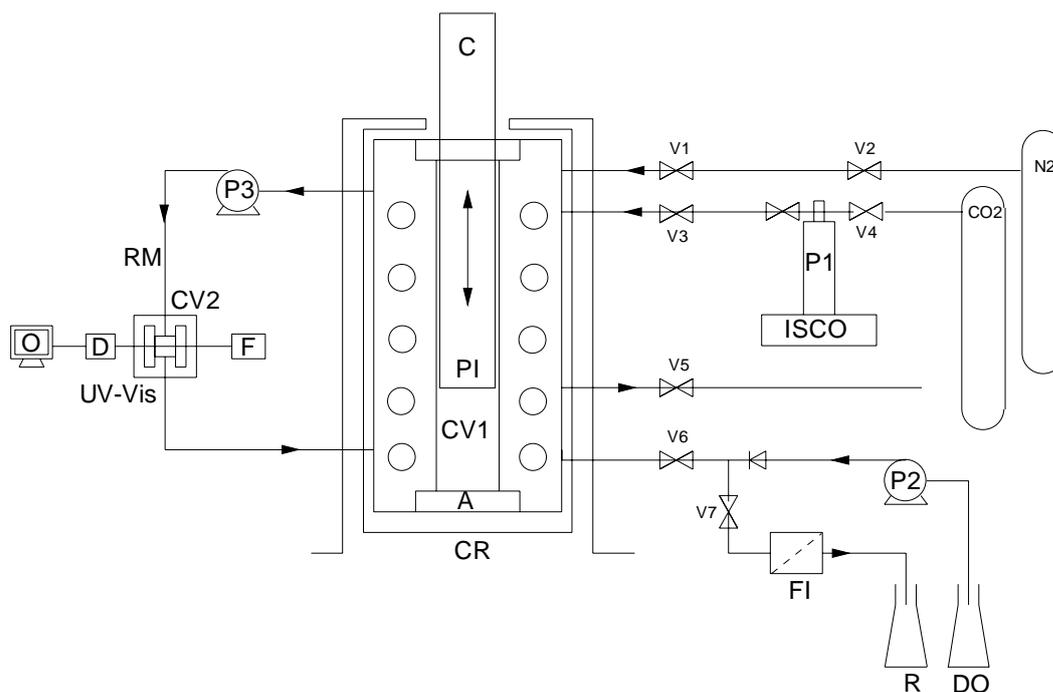
seleccionada para la medir la densidad óptica fue de 500nm, a la cual ni el colesterol ni el CTAB absorben.

### 6.6.2 Densidad óptica a alta presión

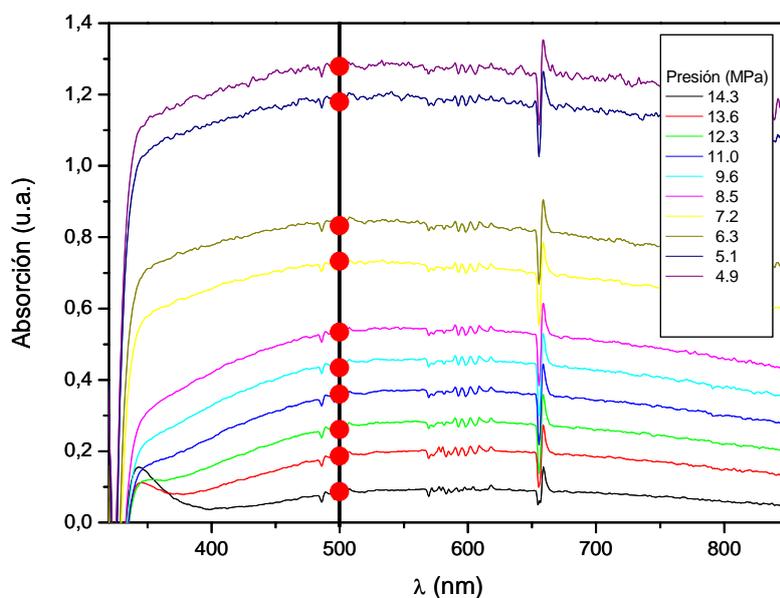
Para llevar a cabo medidas de densidad óptica a alta presión, en diferentes sistemas “disolvente orgánico/agua/CO<sub>2</sub>” y “soluto/disolvente orgánico/agua/CO<sub>2</sub>” con ó sin tensoactivo (ver Capítulos 4 y 5), en la presente Tesis Doctoral se ha rediseñado el analizador de fases a alta presión descrito en el Apartado 6.4 (ver Figura 6.9). Para ello, se acopló en serie al reactor de alta presión *CV1*, una celda espectroscópica de flujo a alta presión *CV2* (Custom Sensors & Technology, modelo 5017-SPQ, USA) con un volumen de 7mL y 1cm de camino óptico, a través del circuito de recirculación. Dicha *CV2* se encuentra conectada, a su vez, a través de fibra óptica a un espectrofotómetro de UV-Visible StellarNet CCD-array (modelo EPPC2000C, StellarNet, Florida, USA). El espectrofotómetro es capaz de medir la absorbancia en función del tiempo a una determinada longitud de onda. El diagrama de flujo del analizador de fases rediseñado está representado en la Figura 6.10.



**Figura 6.9.** Imagen del analizador de fases *CV1* rediseñado con un espectrofotómetro de UV-Visible y una celda espectroscópica de flujo a alta presión *CV2*.



**Figura 6.10.** Diagrama de flujo del analizador de fases rediseñado. A: sistema de agitación; C: cilindro neumático; CV1: celda de volumen variable; CV2: celda espectroscópica de alta presión; CR: cámara de calor o frío; D: detector UV-Vis; DO: disolvente o disolución orgánica; F: fuente de luz UV-Vis; FI: filtro; O: sistema de captación de datos; P: bomba; PI: pistón; R: residuo; RM: sistema de recirculación; V: válvula.



**Figura 6.11.** Espectros de absorción por UV-Visible del sistema “acetona/agua/CO<sub>2</sub>” a T<sub>w</sub>=308 y diferentes valores de presión. (● valor de la absorbancia a λ=500nm).

En el caso de los sistemas “disolvente orgánico/agua/CO<sub>2</sub>” y “soluto/disolvente orgánico/agua/CO<sub>2</sub>” con ó sin tensoactivo, el estudio de la variación de la densidad óptica del sistema inducida por sucesivos cambios de presión, fracción molar de CO<sub>2</sub> o temperatura en el mismo se estudió mediante el análisis de sus espectros de absorción de ultravioleta-visible registrados mediante el espectrofotómetro de ultravioleta-visible acoplado a la celda espectroscópica CV2. La densidad óptica se determinó a partir de la medida de la absorbancia del sistema a  $\lambda=500\text{nm}$  (ver Figura 6.11). A esta longitud de onda ninguno de los componentes del sistema absorbía.

## 6.7 Estudio del sistema vesicular CTAB/colesterol

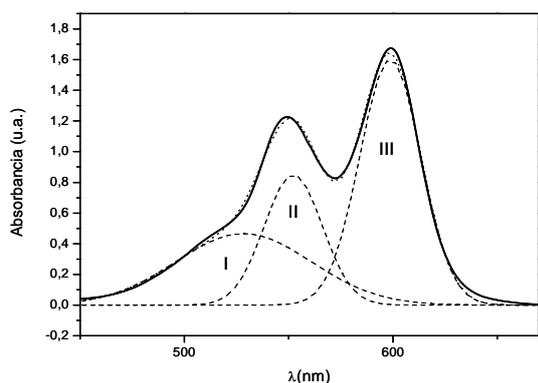
### 6.7.1 Preparación de sistemas dispersos “CTAB/colesterol/H<sub>2</sub>O” por ultrasonidos

Las cantidades deseadas de CTAB y colesterol fueron pesadas en un vial de cristal, y suspendidas en 10mL de agua MilliQ. A continuación se aplicaron ultrasonidos mediante una sonda de ultrasonidos (Vibracell Sonifier titanium, Sonics and Materials corporation, Newtown, USA) durante 2-4 minutos hasta conseguir una dispersión de aspecto homogéneo.

### 6.7.2 Estudios espectroscópicos con el cloruro de pinacianol (PIN)

- **Preparación de sistemas dispersos “CTAB/colesterol/agua” con PIN.** Inicialmente se preparó una disolución stock de PIN 1.8mM en agua MilliQ. En cada preparación, la cantidad requerida de PIN fue depositada en el correspondiente vial, y fue agitada en un vortex durante 1 minuto. En cada preparación 6 $\mu\text{L}$  de la disolución stock de PIN fue mezclada con 2mL de muestra hasta alcanzar una concentración final de PIN de  $5,6 \cdot 10^{-6}\text{M}$ . Todas las preparaciones fueron envueltas en papel de aluminio para protegerlas de la luz, y por tanto, evitar la fotodescomposición del PIN durante su almacenamiento.
- **Medidas espectroscópicas de sistemas dispersos “CTAB/colesterol/agua” con PIN.** Los espectros de absorción UV-Visible del PIN en presencia de

diferentes sistemas dispersos CTAB/colesterol fueron registradas mediante un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 UV/Vis (Perkin-Elmer, USA), usando una pareja de cubetas con 1cm de camino óptico y tasmostatizadas a 298K. De acuerdo al procedimiento descrito por Estelrich et al., cada uno de los espectros fue ajustado a tres curvas de tipo gaussiano con la ayuda del programa de ajuste de curvas Origin7.0, que proporciona el área, anchura y altura de cada una de las funciones gaussianas (ver Figura 6.12.).<sup>(5),(6),(7)</sup>



**Figura 6.12.** Espectro de UV-Visible del PIN en el sistema disperso CTAB/colesterol con una concentración de  $5,6 \cdot 10^{-6} \text{M}$  (—). La deconvolución del espectro mediante su ajuste a una combinación de funciones gaussianas permite descomponer el espectro en tres bandas de absorción I, II y III (---).

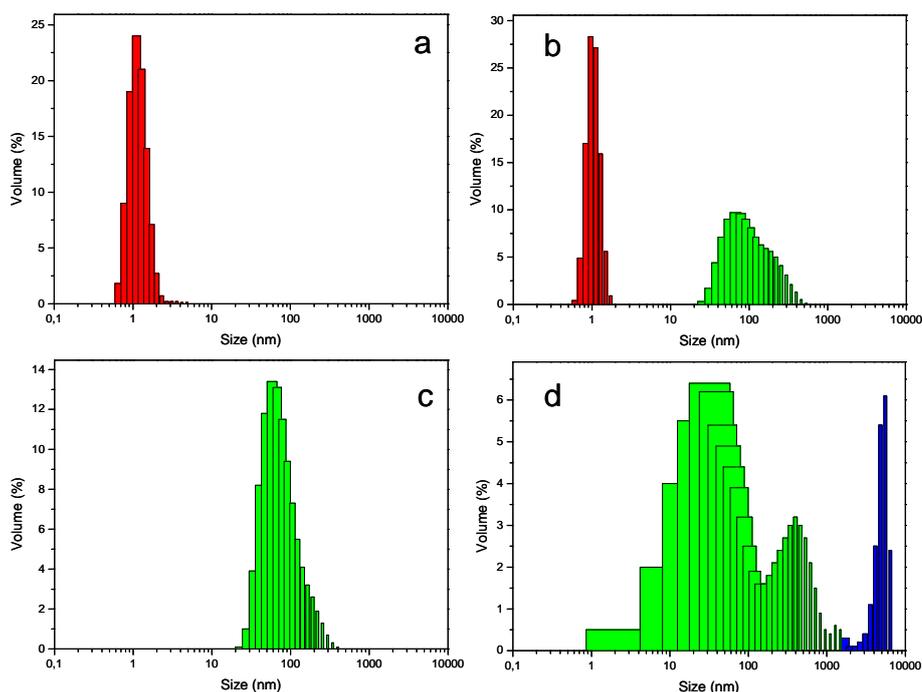
### 6.7.3 Influencia de la acetona residual en los diferentes sistemas dispersos CTAB/colesterol preparados

Cuando un sistema disperso se prepara mediante el proceso DELOS-SUSP, siempre queda una pequeña cantidad residual del disolvente orgánico en el medio después de ser procesado. En este trabajo, también se ha estudiado la influencia que puede tener la acetona residual en el medio, sobre las diferentes organizaciones supramoleculares que puedan adoptar el sistema CTAB/colesterol a diferentes relaciones molares CTAB/colesterol.

De acuerdo al procedimiento descrito en el Apartado 6.7.1, se han preparado por ultrasonidos diferentes sistemas dispersos CTAB/colesterol a diferentes relaciones molares tensoactivo/lípido (comprendidas entre 10.000 y 0,33), manteniendo constante la concentración de CTAB a 0.01M. El medio dispersante utilizado fue agua y acetona, con una relación molar de acetona/agua de  $S=0,11$ , proporción similar a la utilizada en el proceso DELOS-SUSP. En la Figura 6.13 están representadas las curvas de distribución de tamaño medidas por DLS de los diferentes sistemas CTAB/colesterol preparados por ultrasonidos variando la relación molar CTAB/colesterol, en presencia

de agua y acetona como medio dispersante, con una relación molar de acetona/agua de  $S=0,11$ .

En base a los resultados de tamaño de partícula (DLS) (ver Figura 6.13), se ha observado que el sistema CTAB/colesterol se auto-ensambla de manera muy similar en presencia y ausencia de acetona en el medio acuoso, cuando se varía la concentración del colesterol en el medio. Cuando la relación molar CTAB/colesterol es muy superior a 1, el sistema disperso está formado por una organización supramolecular mixta de tipo micelar formada por CTAB y colesterol (Figure 6.13a-b). Cuando el CTAB y colesterol se mezclan en una relación equimolar, la dispersión está constituida principalmente por estructuras tipo bícapa cerrada, es decir, vesículas (Figura 6.13c). Sin embargo, cuando el número de moléculas de CTAB es mucho más pequeño que el de colesterol (CTAB/colesterol  $<1$ ), en la dispersión coexisten vesículas de CTAB/colesterol y cristales de colesterol. El colesterol comienza a precipitar como un sólido cristalino como consecuencia de que las micelas de CTAB presentes en el medio son insuficientes para solubilizar y auto-ensamblar las nuevas moléculas de colesterol disponibles.



**Figure 6.13** Distribuciones de tamaño de partícula en volumen medidas por DLS de los diferentes sistemas dispersos CTAB/colesterol preparados por ultrasonidos variando la relación molar CTAB/colesterol ( $Q$ ) usando acetona y agua ( $S=0,11$ ) como medio dispersante: (a) 10.000, (b) 1.000, (c) 1, (d) 0,33.

## 6.8 Referencias

- (1) (a) Wubbots, F.E. *Ph.D. Thesis*, University of Delft (Netherlands) **2000**; (b) Wubbots, F.E.; Bruinsma, O.S.L; van Rosmalen, G.M. *J.Supercrit. Fluids* **2004**, 32,79.
- (2) (a) Sala, S., *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona **2005**; (b) Muntó, M, *Trabajo de Investigación*, Universidad Autónoma de Barcelona **2005**.
- (3) (a) Wei L.; Zhang, J.; Cheng, S.; Han, B.; Zhang, C.; Feng, X.; Zhao, Y. *Langmuir* **2009**, 25, 196. (b) Cocquyt, J.; Olsson, U.; Olofsson, G.; Meeren, van der P. *Langmuir* **2004**, 20, 3906. (c) Feitosa, E.; Bonassi, N.M.; on Loh, W. *Langmuir* **2006**, 22, 4512-4517. (d) Ollivon, M.; Lesieur, S.; Gabrielle-Madelmont, C.; Paternostre, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1508, 34.
- (4) Feitosa, E.; Alves, F.R.; Anna Niemiec, A.; Oliveira, M.E.C.D.R.; Castanheira, E. M. S.; Baptista, A. L. F. *Langmuir* **2006**, 22, 3579-3585.
- (5) (a) Barazzouk, S.; Lee, H.; Hotchandani, S.; Kamat, P.V *J. Phys. Chem* **2000**, 104, 3616. (b) Zachariasse, K.A.; Van Phuc, N.; Kozankiewicz, B. *J. Phys. Chem* **1981**, 85, 2676. (c) Drummond, C.J.; Grieser, F.; Healy, T.W. *Faraday Discuss Chem. Soc.* **1986**, 81, 95. (d) Sarkar, M.; Poddar, S. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, 221, 181.
- (6) (a) Sabaté, R.; Gallardo, M.; De la Maza, A.; Estelrich, J. *Langmuir* **2001**, 17, 6433. (b) Sabaté, R.; Gallardo, M.; Estelrich, J. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, 233, 205.
- (7) Klotz, I.M. *Chem. Rev.* **1947**, 41, 373.





## Conclusiones generales

- ❖ Se ha desarrollado el nuevo método DELOS-SUSP que permite la preparación de sistemas dispersos mediante la utilización de disolventes expandidos con CO<sub>2</sub>. Se ha demostrado que este método permite obtener materiales dispersos con una elevada homogeneidad a nivel supramolecular, y de tamaño micro- y/o nanoscópico.
- ❖ Por primera vez, se han obtenido mediante el proceso DELOS-SUSP sistemas vesiculares unilamelares en agua de colesterol y CTAB en agua, de dimensiones nanoscópicas, muy homogéneos y estables en el tiempo. Dicho proceso también ha sido aplicado con éxito para la preparación de liposomas del lípido fosfatidilcolina.
- ❖ Se ha demostrado la viabilidad de preparar microemulsiones o/w, estables termodinámicamente, en las que los dominios de disolventes orgánicos expandidos con CO<sub>2</sub> se encuentran dispersos en un medio acuoso.
- ❖ Se ha desarrollado un nuevo método de preparación de materiales sólidos de dimensiones submicrónicas y nanoparticulados, denominado proceso PIWASP (Pressure Induced Water Anti-Solvent Precipitation), basado en la precipitación confinada dentro de microemulsiones con disolventes expandidos con CO<sub>2</sub>.
- ❖ Mediante el proceso de precipitación PIWASP se han preparado partículas de ibuprofeno de dimensiones submicrónicas, muy uniformes en tamaño con una elevada cristalinidad y una morfología esférica, que no son posible preparar mediante otras metodologías de precipitación desde disoluciones.



## Publicaciones

1. S. Sala, N. Ventosa, T. Tassaing, M. Cano, Y. Danten, M. Besnard, J. Veciana. “*Synergistic Enhancement of the Solubility of Hexamethylenetetramine in Subcritical CO<sub>2</sub>-Ethanol Mixtures Studied by Infrared Spectroscopy.*” *ChemPhysChem* **2005**, 6, 587.
2. N. Ventosa, J. Veciana, S. Sala, M. Muntó, M. Cano, M. Gimeno. “*New Technologies for the preparation of micro- and nanostructured materials with potential applications in drug delivery and clinical diagnostics*”, *Contribution to Science* **2005**, 3 (1), 11.
3. S. Sala, M. Gimeno, M.Cano, M. Munto, E.Elizondo, N. Ventosa, J. Veciana, “*DELOS compressed fluid technology for the preparation of micro- and nanoparticulate molecular materials: Main features and scale-up*”. *Afinidad* **2007**, 64, 528.
4. M. Cano-Sarabia, N. Ventosa, S. Sala, C. Patiño, R. Arranz, J. Veciana, “*Preparation of uniform rich cholesterol unilamellar nanovesicles using CO<sub>2</sub>-expanded solvents*”, *Langmuir* **2008**, 24, 2433.
5. M. Cano-Sarabia, N. Ventosa, S. Sala, J. Veciana, “*An easy to scale-up preparation of uniform unilamellar nanovesicles using CO<sub>2</sub>-expanded solvents*”, *NanoNewsletter* **2008**, 11, 28.
6. M. Cano-Sarabia, A. Angelova, N. Ventosa, S. Lesieur, J. Veciana, “*Cholesterol induced CTAB Michelle-to-vesicle transition*”, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2009**. Aceptado.

7. M. Cano-Sarabia, A. Angelova, N. Ventosa, S. Lesieur, J. Veciana, “*Vesicular nanocontainers of cholesterol and CTAB formed by supramolecular self-assembly*”. En preparación.
8. M. Cano-Sarabia, N. Ventosa, S. Sala, J. Veciana, “*Uniform shape and size ibuprofen particles prepared by a new pressure induce water anti-solvent precipitation (PIWASP) methodology*”. En preparación.

## Patentes

1. N. Ventosa, J. Veciana, S. Sala, M. Cano, “Procedimiento para la obtención de sistemas micro- y nano- dispersos”, **2005**, Patente española ESP P200500172, European Patent application PCT WO2006/0799889 A1. PCT WO2006/0799889 A1.
2. N. Ventosa, J. Veciana, S.Sala, M. Cano, “Procedimiento para la obtención de micro- o nanopartículas sólidas”, **2008**, Patent priority number: P200803753